

P19743.P03

## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant :M. TAKEDA et al.

Serial No. :Not Yet Assigned

PCT Branch

Filed :Concurrently Herewith

PCT/JP99/00015

For :GENE MUTATED ANIMAL

## CLAIM OF PRIORITY

Commissioner of Patents and Trademarks  
Washington, D.C. 20231

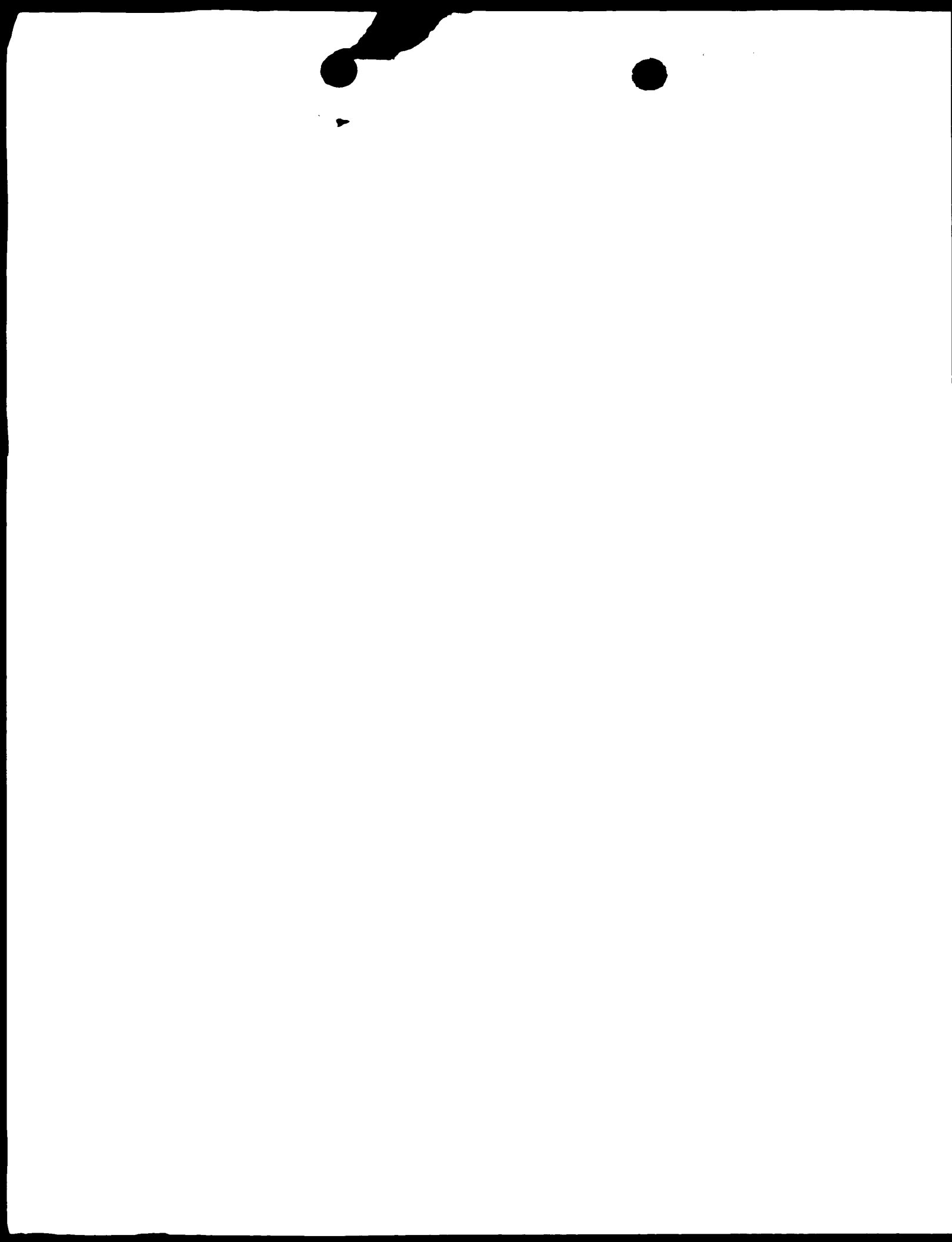
Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application No. 10-2191, filed January 8, 1998. The International Bureau already should have sent a certified copy of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,  
M. TAKEDA et al.

*Leslie Papernow Reg 16*  
Bruce H. Bernstein 33,329  
Reg. No. 29,027

July 7, 2000  
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.  
1941 Roland Clarke Place  
Reston, VA 20191  
(703) 716-1191



09/581528  
PCT/JP99/00015  
07.01.99

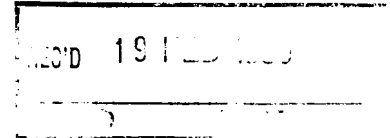
日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年 1月 8日



出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第002191号

出 願 人  
Applicant(s):

第一製薬株式会社

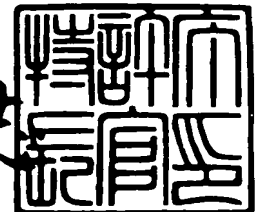
5

PRIORITY DOCUMENT

1999年 2月 5日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3004578

【書類名】 特許願

【整理番号】 97365M

【提出日】 平成10年 1月 8日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 遺伝子変異動物

【請求項の数】 45

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府高槻市弥生が丘町49の25

【氏名】 武田 雅俊

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田西三丁目38の9

【氏名】 竹田 潤二

【特許出願人】

【識別番号】 000002831

【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 038357

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

特平 1 0 - 0 0 2 1 9 1

【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝子変異動物

【特許請求の範囲】

【請求項1】 変異プレセニリン遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項2】 プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有する請求項1記載の遺伝子変異動物。

【請求項3】 プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列において、次の番号：

第79番、第82番、第96番、第115番、第120番、第135番、第139番、第143番、第146番、第163番、第209番、第213番、第231番、第235番、第246番、第250番、第260番、第263番、第264番、第267番、第269番、第280番、第285番、第286番、第290番、第318番、384番、第392番、第410番、第426番、及び第436番からなる群から選ばれる1又は2以上の箇所のアミノ酸が他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有する変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含むプレセニリン-1変異遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項4】 プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列において、

A79V、V82L、V96F、Y115H、Y115C、E120K、E120D、N135D、M139V、M139T、M139I、I143F、I143T、M146L、M146V、H163Y、H163R、G209V、I213T、A231T、A231V、L235P、A246E、L250S、A260V、C263R、P264L、P267S、R269G、R269G、R269H、E280A、E280G、A285V、L286V、S290C、E318G、G384A、L392V、C410Y、A426P、及びP436S、

(ここで、各アルファベットは一文字表記法によるアミノ酸を意味しており、数字はプレセニリン-1蛋白のN末端からのアミノ酸番号を示し、数字左側に示す野生型のアミノ酸が右側のアミノ酸に置換されていることを示す。)

からなる群から選ばれる1又は2以上の変異を有する変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の

遺伝子変異動物。

【請求項5】 プレセニリン-1の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項6】 プレセニリン-1の第213番のイソロイシンがスレオニンに置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA塩基配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項7】 プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、NはT以外の塩基を意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)に変異した変異プレセニリン-1遺伝子を有する請求項1ないし6のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項8】 プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、NはCを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)に変異した変異プレセニリン-1遺伝子を有する請求項1ないし6のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項9】 プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC XYZ CACTGGAAAGGCC-3'

(ただし、XYZはイソロイシン以外のアミノ酸をコードする3塩基のコドンを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213番のアミノ酸をコードする塩基である。)に変異した変異プレセニリン-1遺伝子を有する請求項1ないし6のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項10】 プレセニリン-2蛋白のアミノ酸配列において、第141番及

び／又は436番のアミノ酸が他のアミノ酸に置換した蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-2遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項11】 プレセニリン-2蛋白のアミノ酸配列において、N141I及び／又はM239V（ここで、各アルファベットは一文字表記法によるアミノ酸を意味しており、数字はプレセニリン-2蛋白のN末端からのアミノ酸番号を示し、数字左側に示す野生型のアミノ酸が右側のアミノ酸に置換されていることを示す。）の変異を有する変異プレセニリン-2蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-2遺伝子を有する請求項10に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項12】 アミロイドβ蛋白の過剰発現が変異プレセニリン-1遺伝子及び／又は変異プレセニリン-2遺伝子に起因するものである、請求項1ないし11のいずれか1項に記載の遺伝子変異動物。

【請求項13】 変異プレセニリン蛋白を発現することができ、かつ該蛋白の発現が、哺乳類動物の脳の大脳皮質周辺部において進行性の神経疾患を形成させるのに十分な量のアミロイドβ蛋白を生産させるものである、請求項1ないし12のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項14】 遺伝子変異動物が哺乳類動物の齧歯類である請求項1ないし13のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項15】 遺伝子変異動物がマウスである請求項1ないし14のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項16】 変異プレセニリン-1遺伝子及び／又は変異プレセニリン-2遺伝子が相同組換えにより導入された請求項1ないし15のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項17】 変異プレセニリン-1遺伝子により引き起こされた脳組織でのアミロイド蛋白の発現量が、正常動物と比較して記憶学習試験において障害された行動を引き起こし、かつ当該動物の脳の海馬の大脳皮質周辺部において異常な神経病理を誘発するのに十分であることを特徴とする、請求項1ないし16のいずれか1項に記載のヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項18】 プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の1又は2以上のアミ



ノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子とマーカー蛋白をコードする塩基配列とを含むDNA配列を有するヒト以外の遺伝子変異動物。

【請求項19】 プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の第213 番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、NはA、G、又はCを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213 番のアミノ酸をコードする塩基である。) である変異プレセニリン-1 遺伝子のDNA配列又はその部分配列を含むプラスミド。

【請求項20】 プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の第213 番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子であって、第213 番のアミノ酸の付近をコードするDNA配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC XYZ CACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、MはT又はCを意味し、XYZはイソロイシン以外をコードする3塩基のコドンを意味し、下線を付した塩基が第213 番のアミノ酸をコードする塩基である。) である遺伝子のDNA配列又はその部分配列を含むプラスミド。

【請求項21】 プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の第213 番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子のエキソン8を含む染色体DNA。

【請求項22】 プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の第213 番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子のcDNA又は染色体DNAの全長又は変異部分を含む塩基配列に対して Sau3AI 部位が導入されたDNAを含むプラスミド。

【請求項23】 アミノ酸の置換が213 番のイソロイシンからスレオニンへの置換である請求項22に記載のプラスミド。

【請求項24】 下記の塩基配列：

5'-TGTGGTCGGGATGAMCGCCACCCACTGGAAAGGCCC-3'

(ここでMはT又はCを意味する。)

で特定されるDNAを含むプラスミド。

【請求項25】 マウス・プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換したマウス変異プレセリニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む遺伝子。

【請求項26】 アミノ酸の置換がイソロイシンからスレオニンへの置換である請求項25に記載の遺伝子。

【請求項27】 (1) マウス・プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換したマウス変異プレセリニリン-1蛋白をコードする遺伝子、及び(2) loxPではさまれたネオマイシン発現ユニットを含むプラスミド。

【請求項28】 アミノ酸の置換がイソロイシンからスレオニンへの置換である請求項27に記載のプラスミド。

【請求項29】 下記の塩基配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCCACCCACTGGAAAGGCCC-3'

(ここでMはT又はCを意味する。)

で特定されるDNAを含むプラスミドが導入されたことを特徴とする胚。

【請求項30】 請求項20、請求項22、請求項23、請求項24、請求項27、又は請求項28に記載のプラスミドを用いた相同組換えにより得られた胚。

【請求項31】 胚が哺乳類動物の齧歯類由来の胚である請求項29又は30に記載の胚。

【請求項32】 マウス由来の胚性幹細胞である請求項29ないし31のいずれか1項に記載の胚。

【請求項33】 請求項1ないし18のいずれか1項に記載の遺伝子変異動物の細胞を単離し、組織培養により培養することにより得られる初代培養細胞又は継代培養細胞。

【請求項34】 変異プレセニリン-1蛋白を発現することができ、かつ該蛋白の発現が脳の海馬又は大脳皮質周辺部において進行性の神経疾患を形成させるのに十分な量のアミロイドβ蛋白を生産させることができる変異プレセニリン-1遺伝子を相同組換え法により動物の胚に導入する工程を含む、ヒト以外の遺伝子変

異動物の作製方法。

【請求項 35】 請求項34に記載の遺伝子変異動物の作製方法において、第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に変異した変異プレセニリン-1変異蛋白を発現する方法。

【請求項 36】 被検物質を投与した請求項1ないし18のいずれか1項に記載の遺伝子変異動物と無投与又は対照物質を投与した該動物との比較を行う工程を含む、アルツハイマー病の治療及び／又は予防に有用な物質の評価方法。

【請求項 37】 記憶学習試験により比較を行う請求項36に記載の評価方法。

【請求項 38】 病理試験により比較を行う請求項36に記載の評価方法。

【請求項 39】 大脳皮質周辺部での神経病理に基づく病理試験により比較を行う請求項36に記載の評価方法。

【請求項 40】 神経病理に基づく病理試験による比較が、当該脳の大脳皮質周辺部での肥大したグリオーシスの減少の抑制、当該脳の大脳皮質周辺部での2-デオキシグルコース取り込みの減少の抑制、及び当該脳の大脳皮質での2-デオキシグルコース利用の減少の抑制からなる群から選択される1又は2以上の項目の比較である、請求項38又は39に記載の評価方法。

【請求項 41】 当該動物の生存期間、探索行動、及び移動行動からなる群から選ばれる1又は2以上の項目について比較を行う請求項36に記載の評価方法。

【請求項 42】 請求項33に記載の初代培養細胞又は継代培養細胞を被検化合物の存在下でイン・ビトロ細胞培養する工程を含む、アルツハイマー病の治療及び／又は予防剤の評価方法。

【請求項 43】 OS-2型変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子の部分塩基配列を用いることを特徴とする、アルツハイマー病又はアルツハイマー病の発症可能性の診断方法。

【請求項 44】 請求項36ないし42のいずれか1項に記載の評価方法により選択されたアルツハイマー病の治療及び／又は予防に有用な物質。

【請求項 45】 請求項44に記載の物質を有効成分として含むアルツハイマー病の治療剤及び／又は予防剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子導入動物に関するものである。より詳しくは、ヒト・アルツハイマー病を惹起するプレセニリン遺伝子の変異を導入したプレセニリン遺伝子導入動物に関する。

【0002】

【従来の技術】

アルツハイマー病は進行性の痴呆症状を呈する疾患であり、脳内での著しく多数の老人斑の出現と神経原線維変化の神経細胞内蓄積を病理組織学的特徴とし、緩徐に神経細胞が障害され脱落する神経変性疾患である。アルツハイマー病は高齢者に発症することが多く、加齢とともに罹患者の比率が増大することが知られている。現在のところアルツハイマー病の根治は不可能であり、将来的な高齢者人口の急増に備えてアルツハイマー病に対する治療や予防のための方法、並びにアルツハイマー病に対して有効な予防・治療剤の早急な開発が切望されている。

【0003】

老人斑は種々の成分を含む神経細胞外の沈着物であり、アミロイドβタンパク(Aβ)と呼ばれる39～42個のアミノ酸残基からなるペプチドを主成分としている。アミロイドβはアミロイド前駆体タンパク(amyloid precursor protein: APP)よりβセクレターゼとγセクレターゼと仮称されているプロテアーゼで切断されて生じる。老人斑では、アミロイドβがβシート構造をとった堅固な構造物として沈着している。老人斑はび慢性老人斑と呼ばれる“しみ”状の沈着から始まるが、この段階では神経変性は生じておらず、更にび慢性老人斑が堅固な沈着物となるとともに、神経変性や神経細胞の脱落が生じることによって痴呆などのアルツハイマー病の症状が現れるものと考えられている。アミロイドβとしては主に40アミノ酸残基よりなるAβ40と42アミノ酸残基よりなるAβ42が存在する。細胞が生成するアミロイドβの大部分はAβ40であり、Aβ42は僅かに存在しているにすぎないが、Aβ42の方が凝集性が高く、Aβ40と比較して老人斑形成に果たす役割は大きいと考えられている(玉岡：内科

77巻、843 頁、1996年）。

【0004】

アルツハイマー病には常染色体優性の遺伝を示す家族性の発症が認められる。この家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として最初に見つけられたものは、1991年第717番目のアミノ酸残基がバリンからイソロイシンに変異しているAPPの突然変異体であり、この遺伝子は21番染色体上に存在する（Goate A. 等：Nature 349巻、704 頁、1991年）。

【0005】

この他、アルツハイマー病の原因となるAPPの突然変異体として、同じく第717番目のアミノ酸残基がフェニルアラニンに変換したもの（Murrell J. 等：Science 254巻、97頁、1991年）、同じ位置のアミノ酸残基がグリシンへ変異したもの（Chartier, Harlin等：Nature 353 巻、844 頁、1991年）、第670番目と第671番目の2アミノ酸残基がリジン・メチオニンからアスパラギン・ロイシンに変異したもの（Mullan M. 等：Nature Genet. 1巻、345 頁、1992年）、第692番目のアミノ酸残基がアラニンからグリシンに変異したもの（Hendrick L. 等：Nature Genet. 1巻、218 頁、1992年）等が見い出されている。

【0006】

家族性アルツハイマー病の原因因子あるいは危険因子としてアポリポタンパクE（apo E）が1993年に報告された。すなわち、19番染色体上に遺伝子が存在するapo Eのアイソマーのうち第112番目のアミノ酸残基がアルギニンであり、第158番目のアミノ酸残基がアルギニンであるapo E4を保有する者の比率がアルツハイマー病患者では健常人と比較して有意に高いことが見つめられた（Corder E. H. 等：Science 261 巻、921 頁、1993年）。

【0007】

その後、1995年にアルツハイマー病の新たな原因遺伝子として、14番染色体上に存在する「プレセリニン-1」（PS-1；当初はS182と呼ばれていた）の遺伝子（Sherrington R. 等：Nature 375巻、754 頁、1995年）の突然変異体および1番染色体上に存在する「プレセニリン-2」（PS-2；当初はE5-1あるいはSTM-2と呼ばれていた）の遺伝子（Rogaev E. I. 等：Nature 376 巻、775 頁、1995年）の

突然変異体が見いだされた（本明細書において、それぞれの遺伝子を「プレセニリン-1遺伝子」及び「プレセニリン-2遺伝子」と呼ぶ。また、それらの遺伝子産物をそれぞれ「プレセニリン-1蛋白」及び「プレセニリン-2蛋白」、又は「PS-1」及び「PS-2」と呼ぶ。）。

【0008】

プレセニリン-1蛋白及びプレセニリン-2蛋白はそれぞれ467 アミノ酸残基および448 アミノ酸残基よりなる7回（又は8回）膜貫通型の1次構造を有しており、膜タンパクとして存在していると推測されている。両者のアミノ酸レベルでのホモロジーは高く、全体で67%、膜貫通部のみでは84%である。プレセニリン-1蛋白の機能に関しては、線虫のsel-12タンパクやSPE-4タンパクとの高い相同性から、これらのタンパクと機能が類似している可能性が指摘されている。SPE-4タンパクは線虫の精子形成過程に関与するタンパクであり、タンパクの輸送・貯蔵に関与しているとされている。

【0009】

従って、プレセニリン-1蛋白はAPPのような膜タンパクのプロセッシング、軸索輸送、膜小胞の膜との融合過程などに関与する可能性が考えられている。また、sel-12は線虫の発生過程を制御しているlin-12の突然変異による発生異常を救済する遺伝子として発見された。lin-12は細胞間情報伝達に関与していると考えられており、プレセニリン-1蛋白も細胞間情報伝達のどこかに関与している可能性も示唆されている。

【0010】

プレセニリン-1蛋白については、最初の報告では家族性アルツハイマー病の原因となる突然変異は5ヶ所のアミノ酸残基の置換が記載されている。この報告以降、本発明者等の報告したOS-2（第213番目のアミノ酸残基イソロイシンがスレオニンに変異）およびOS-3（第96番目のアミノ酸残基バリンがフェニルアラニンに変異）（Kamino K. 等：Neurosci. Lett. 208 巻、195頁、1996年）を初めとして、多くの家族性アルツハイマー病の家系から様々な個所での突然変異体が見つけられているおり、現在では30ヶ所以上で40種類以上のアミノ酸残基の置換が知られている（Hardy：TINS 20 巻、154 頁、1997年）。

## 【0011】

現在ではプレセニン-1蛋白の突然変異は家族性アルツハイマー病の70～80%を占めると考えられている。PS-2については2ヶ所の突然変異が報告されている。以上述べたように、PS-1およびPS-2の突然変異体は家族性アルツハイマー病と深く関連していることは遺伝学的解析からは証明されている。

## 【0012】

一方、最近、プレセニン-1蛋白及びプレセニン-2蛋白の突然変異体がどのような機作でアルツハイマー病の発症の原因となっているかに関する研究も進められている。これらの突然変異体を持つアルツハイマー病患者の血清中や皮膚の線維芽細胞の培養液 (Scheuner D. 等: Nature Med. 2巻、864頁、1996年)、プレセニン-1蛋白及びプレセニン-2蛋白の突然変異体で形質転換した培養細胞株の培溶液中 (Xia W. 等: J. Biol. Chem. 272巻、7977頁、1997年。Borchelt DR等: Neuron 17巻、1005頁、1996年。Citron M. 等: Nature Med. 3巻、67頁、1997年)、及びプレセニン-1蛋白の突然変異体を持つ家族性アルツハイマー病患者の脳組織 (Lemere C.A. 等: Nature Med. 2巻、1146頁、1996年) において、 $A\beta 40$ は正常型のプレセニン-1蛋白及びプレセニン-2蛋白に比べて殆ど変化が見られないが、 $A\beta 42$ は正常型のプレセニン-1蛋白及びプレセニン-2蛋白と比較して大きく増加していることが報告されている。

## 【0013】

すなわち、家族性アルツハイマー病をもたらすプレセニン-1蛋白及びプレセニン-2蛋白の突然変異は、老人斑の形成に大きな役割を果たすと考えられている $A\beta 42$ を増加させることにより、アルツハイマー病を発症させる可能性が示されている。プレセニン-1蛋白の突然変異体をコードする遺伝子を導入したトランスジェニックマウスも作製されている (Duff K. 等: Nature 383巻、710頁、1996年。Borchelt DR. 等: Neuron 17巻、1005頁、1996年。Citron M. 等: Nature Med. 3巻、67頁、1997年)。これらのトランスジェニックマウスにおいてマウス脳内の $A\beta 42$ が特異的に増加していることが報告されている。この結果は、家族性アルツハイマー病をもたらすプレセニン-1蛋白及びプレセニン-2蛋白の突然変異体は、老人斑の形成に大きな役割を果たすと考えられている

A $\beta$ 42を増加させることにより、アルツハイマー病を発症させる可能性を強く支持するものである。しかしながら、これらのトランスジェニックマウスの報告ではトランスジェニックマウスの脳の組織学的検討に関する記載はされていない。これはトランスジェニックマウスで顕著な脳の組織学的変化が観察されていないことを推察させる。

## 【0014】

一般的に、トランスジェニック動物は、対象とする遺伝子の生体内での機能を解析する手段としては有用である。しかしながら、導入した遺伝子の発現を量的・発現組織的・発生上の発現時期的に制御することは技術的に困難である。また、動物自体が持っている遺伝子が正常に発現しているために、トランスジェニック動物の体内では両方の遺伝子産物が混在した状態にあり、導入した遺伝子の機能解析が十分できないという問題もある。さらに、導入した遺伝子が特に過剰に発現される場合、本来生体内で果たしていない機能がトランスジェニック動物では現れてしまう場合があり、その結果、作製した遺伝子変異動物の解析に混乱をもたらすおそれがある等の難点もある。

## 【0015】

トランスジェニック動物とは別に、対象とする遺伝子の機能を解析する手段としてノックアウト動物を利用することができる。ノックアウト動物は、動物自体が持っている対象の遺伝子を人工的に破壊して機能できない状態にしたものである。ノックアウト動物を詳細に解析することにより、対象としている遺伝子の生体内での機能を明らかにすることができる。しかしながら、破壊した遺伝子の産物の機能をノックアウト動物体内の別の遺伝子産物が代替するため、ホモ化してもノックアウト動物自体に特段の変化が現れてこないことがあり、また、破壊した遺伝子の産物が動物の発生上・成育上必須であるためにホモでは致死となってしまう、成長可能なヘテロでは遺伝子の機能の詳細な解析が事実上不可能な場合があるという問題点も有している。

## 【0016】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、アルツハイマー病の病態モデル動物の作製にあたり、前記の



ような欠点を有するトランスジュニック動物ではなく、ヒトにおけるアルツハイマー病患者の病態により近いモデル動物を提供することにある。より具体的には、アルツハイマー病の原因遺伝子と考えられるプレセニリン遺伝子に変異を加えた遺伝子（変異プレセニリン遺伝子）を相同組換え法で導入することにより、変異プレセニリン蛋白を脳内で発現可能な遺伝子変異動物を提供することが本発明の課題である。また、本発明の別の課題は、上記の遺伝子変異動物の作製方法、該作製方法に有用なプラスミド、及び該遺伝子変異動物を用いてアルツハイマー病の予防及び／又は治療に有用な物質を評価する方法を提供することにある。

【0017】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、プレセニリン-1蛋白の役割を解明するため、及びプレセニリン-1遺伝子の突然変異がどのような機作でアルツハイマー病を引き起こすのか解析するため、マウス自体が持っているプレセニリン-1遺伝子を上記0S-2型の変異をもつプレセニリン-1遺伝子と入れ換えたノックインマウスを作製した。その結果、この遺伝子変異動物がトランスジュニックマウス及びノックアウトマウスの持つ欠点を回避することができ、変異プレセニリン-1遺伝子をもつ家族性アルツハイマー病の病因・病態解明に有用であることを見出した。本発明者らはさらに研究を続け、下記に述べる本発明を完成するに至った。

【0018】

すなわち本発明は、変異プレセニリン遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物を提供するものであり、より好ましくは、プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有する遺伝子変異動物を提供するものである。

【0019】

また、プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列、好ましくはマウス由来のプレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列において、次の番号：

第79番、第82番、第96番、第115番、第120番、第135番、第139番、第143番、第146番、第163番、第209番、第213番、第23

1番、第235番、第246番、第250番、第260番、第263番、第264番、第267番、第269番、第280番、第285番、第286番、第290番、第318番、384番、第392番、第410番、第426番、及び第436番からなる群から選ばれる1又は2以上の箇所のアミノ酸が他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有する変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含むプレセニリン-1変異遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物；

【0020】

及び、プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列、好ましくはマウス由来のプレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列においてにおいて、

A79V、V82L、V96F、Y115H、Y115C、E120K、E120D、N135D、M139V、M139T、M139I、I143F、I143T、M146L、M146V、H163Y、H163R、G209V、I213T、A231T、A231V、L235P、A246E、L250S、A260V、C263R、P264L、P267S、R269G、R269G、R269H、E280A、E280G、A285V、L286V、S290C、E318G、G384A、L392V、C410Y、A426P、及びP436S、

(ここで、各アルファベットは一文字表記法によるアミノ酸を意味しており、数字はプレセニリン-1蛋白のN末端からのアミノ酸番号を示し、数字左側に示す野生型のアミノ酸が右側のアミノ酸に置換されていることを示す。以下、本明細書において同様に表示する。)

からなる群から選ばれる1又は2以上の変異を有する変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物が提供される。

【0021】

さらに、プレセニリン-1の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物；及び、プレセニリン-1の第213番のイソロイシンがスレオニンに置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードするDNA塩基配列を含む変異プレセニリン-1遺伝子を有するヒ

ト以外の遺伝子変異動物が提供される。

【0022】

これらの発明の好ましい態様に従い、

プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の第213 番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、NはT以外の塩基を意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213 番のアミノ酸をコードする塩基である。) に変異した変異プレセニリン-1 遺伝子を有する上記遺伝子変異動物；

プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の第213 番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC ANC CACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、NはCを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213 番のアミノ酸をコードする塩基である。) に変異した変異プレセニリン-1 遺伝子を有する上記遺伝子変異動物；

プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の第213 番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列

5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC XYZ CACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、XYZはイソロイシン以外のアミノ酸をコードする3塩基のコドンを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基が第213 番のアミノ酸をコードする塩基である。) に変異した変異プレセニリン-1 遺伝子を有する上記遺伝子変異動物が提供される。

【0023】

別の観点からは、本発明により、プレセニリン-2 蛋白のアミノ酸配列において、第141番及び／又は436番のアミノ酸が他のアミノ酸に置換した蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-2 遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物が提供され、その好ましい態様として、プレセニリン-2 蛋白のアミノ酸配列において、N141I及び／又はM239V(ここで、各アルファベットは一文字表記法によるアミノ酸を意味しており、数字はプレセニリン-1 蛋

白のN末端からのアミノ酸番号を示し、数字左側に示す野生型のアミノ酸が右側のアミノ酸に置換されていることを示す。)の変異を有する変異プレセニリン-2蛋白をコードするDNA配列を含む変異プレセニリン-2遺伝子を有するヒト以外の遺伝子変異動物が提供される。

## 【0024】

これらの遺伝子変異動物の好ましい態様として、アミロイドβ蛋白の過剰発現が変異プレセニリン-1遺伝子及び／又は変異プレセニリン-2遺伝子に起因する上記の遺伝子変異動物；変異プレセニリン蛋白を発現することができ、かつ該蛋白の発現が、哺乳類動物の脳の大脳皮質周辺部において進行性の神経疾患を形成させるのに十分な量のアミロイドβ蛋白を生産させるものである上記遺伝子変異動物；哺乳類動物の齧歯類、好ましくはマウスである上記遺伝子変異動物；変異プレセニリン-1遺伝子及び／又は変異プレセニリン-2遺伝子が相同組換えにより導入された上記遺伝子変異動物；変異プレセニリン-1遺伝子により引き起こされた脳組織でのアミロイド蛋白の発現量が、正常動物と比較して記憶学習試験において障害された行動を引き起こし、かつ当該動物の脳の海馬の大脳皮質周辺部において異常な神経病理を誘発するのに十分であることを特徴とする、上記遺伝子変異動物；並びに、プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の1又は2以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子とマーカー蛋白をコードする塩基配列とを含むDNAを有するヒト以外の遺伝子変異動物が提供される。

## 【0025】

さらに別の観点からは、プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸の近辺をコードするDNA配列が、次の配列：5'-TGTTGGTCGGGATGATMGCCANC CACTGGAAAGGCCC-3'（ただし、NはA、G、又はCを意味し、MはT又はCを意味し、下線を付した塩基は第213番のアミノ酸をコードする塩基である。）である変異プレセニリン-1遺伝子を含むプラスミド；及びプレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子であって、第213番のアミノ酸の付近をコードするDNA配列が、

次の配列：5'-TGTGGTCGGGATGATMGCC\_XYZ\_CACTGGAAAGGCCC-3'（ただし、MはT又はCを意味し、XYZはイソロイシン以外をコードする3塩基のコドンを意味し、下線を付した塩基は第213番のアミノ酸をコードする塩基である。）である遺伝子を含むプラスミドが提供される。プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子のエキソン8を含む染色体DNAも提供される。

## 【0026】

また、プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のアミノ酸がイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1蛋白をコードする変異プレセニリン-1遺伝子のcDNA又は染色体DNAの全長又は変異部分を含む塩基配列に対してSau3AI部位が導入されたDNAを含むプラスミドが提供され、アミノ酸の置換が213番のイソロイシンからスレオニンへの置換である上記プラスミド；下記の塩基配列：5'-TGTGGTCGGGATGATMGCCACCCACTGGAAAGGCCC-3'（ここでMはT又はCを意味する。）で特定されるDNAを含むプラスミドが提供される。

## 【0027】

これらに加えて、マウス・プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換したマウス変異プレセニリン-1蛋白をコードする遺伝子；アミノ酸の置換がイソロイシンからスレオニンへの置換である上記遺伝子が提供される。また、(1)マウス・プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換したマウス変異プレセニリン-1蛋白をコードする遺伝子、及び(2)loxPでは含まれたネオマイシン発現ユニットを含むプラスミド；アミノ酸の置換がイソロイシンからスレオニンへの置換である上記プラスミドも提供される（loxPについては、すでに特表平4-501501号公報の第4頁に開示されている）。

## 【0028】

さらに別の観点から、下記の塩基配列：5'-TGTGGTCGGGATGATMGCCACCCACTGGAAAGGCCC-3'（ここでMはT又はCを意味する。）で特定されるDNAを含むプラス

ミドが導入されたことを特徴とする胚；上記の各プラスミドを用いた相同組換えにより得られた胚；及び、哺乳類動物の齧歯類由来、好ましくはマウス由来の上記胚が提供される。また、上記の遺伝子変異動物の細胞を単離し、組織培養により培養することにより得られる初代培養細胞又は継代培養細胞；並びに、変異プレセニリン-1 蛋白を発現することができ、かつ該蛋白の発現が脳の大脳皮質周辺部において進行性の神経疾患を形成させるのに十分な量のアミロイドβ 蛋白を生産させることができる変異プレセニリン-1 遺伝子を相同組換え法により動物の胚に導入する工程を含む、ヒト以外の遺伝子変異動物の作製方法；及び第 213 番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に変異した変異プレセニリン-1 変異蛋白を発現することができる上記方法が提供される。

#### 【0029】

また、被検化合物を投与した上記遺伝子変異動物と無投与の該動物との比較を行う工程を含む、アルツハイマー病の治療及び／又は予防に有用な物質の評価方法が提供される。この評価方法の代表例としてスクリーニング方法を挙げることができる。この発明の好ましい態様によれば、記憶学習試験により比較を行う上記評価方法；病理試験により比較を行う上記評価方法；大脳皮質周辺部での神経病理に基づく病理試験により比較を行う上記評価方法；神経病理に基づく病理試験による比較が、当該脳の大脳皮質周辺部での肥大したグリオシスの減少の抑制、当該脳の大脳皮質周辺部での 2-デオキシグルコース取り込みの減少の抑制、及び当該脳の大脳皮質での 2-デオキシグルコース利用の減少の抑制からなる群から選択される 1 又は 2 以上の項目の比較である上記評価方法；並びに、当該動物の生存期間、探索行動、及び移動行動からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の項目について比較を行う上記評価方法が提供される。

#### 【0030】

さらに、上記初代培養細胞又は継代培養細胞を被検化合物の存在下でイン・ビトロ細胞培養する工程を含む、アルツハイマー病の治療及び／又は予防剤の評価方法；OS-2型変異プレセニリン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子の部分塩基配列を用いることを特徴とする、アルツハイマー病又はアルツハイマー病の発症可能性の診断方法；上記の各評価方法により選択されたアルツハイ

マー病の治療及び／又は予防に有用な物質；並びに、上記物質を有効成分として含むアルツハイマー病の治療及び／又は予防剤が提供される。

【0031】

【発明の実施の形態】

本発明の遺伝子変異動物の作製に用いられる変異プレセニリン遺伝子（本明細書において「変異プレセニリン遺伝子」という場合には、変異プレセニリン-1遺伝子及び変異プレセニリン-2遺伝子のいずれか片方又は両者を意味する）は、変異プレセニリン蛋白（本明細書において「変異プレセニリン蛋白」という場合には、変異プレセニリン-1蛋白及び変異プレセニリン-2蛋白のいずれか片方、又は両者を意味する）をコードする遺伝子である。この変異プレセニリン遺伝子はアミロイドβ蛋白の生産量を増加させる性質を有している。本発明の遺伝子変異動物は、上記の変異プレセニリン遺伝子が、例えば相同組換え法により導入された哺乳類動物である。変異プレセニリン蛋白に存在する変異は、好ましくはアミノ酸残基の置換により生じたものであり、その変異の個数は制限されないが、好ましくは1個である。

【0032】

哺乳類動物由来のプレセニリン-1蛋白の全長は、例えば E. Levy-Lahad, et al., Science, 269, pp.973-977, 1995に記載されている。ヒト及びマウス由来のプレセニリン-1蛋白の全長及び該蛋白をコードするDNA の一例をそれぞれ配列表の配列番号1及び2に示した。例えばマウス由来のプレセニリン-1蛋白においては、変異部位は、第79番、第82番、第96番、第115番、第120番、第135番、第139番、第143番、第146番、第163番、第209番、第213番、第231番、第235番、第246番、第250番、第260番、第263番、第264番、第267番、第269番、第280番、第285番、第286番、第290番、第318番、384番、第392番、第410番、第426番、及び第436番から選ばれる1又は2個所以上であることが好ましい。

【0033】

より好ましい変異は、プレセニリン-1蛋白のアミノ酸配列、より好ましくは

マウス由来のプレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列において、A 79 V、V 82 L、V 96 F、Y 115 H、Y 115 C、E 120 K、E 120 D、N 135 D、M 139 V、M 139 T、M 139 I、I 143 F、I 143 T、M 146 L、M 146 V、H 163 Y、H 163 R、G 209 V、I 213 T、A 231 T、A 231 V、L 235 P、A 246 E、L 250 S、A 260 V、C 263 R、P 264 L、P 267 S、R 269 G、R 269 G、R 269 H、E 280 A、E 280 G、A 285 V、L 286 V、S 290 C、E 318 G、G 384 A、L 392 V、C 410 Y、A 426 P、及び P 436 S からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の変異である。これらの変異のうち、第 213 番のアミノ酸が他のアミノ酸へ置換する変異（本明細書において「OS-2型変異」という場合がある。）は特に好ましい変異であり、例えば、第 213 番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸に置換した変異、又は第 213 番のイソロイシンがスレオニンに置換した変異が特に好適である。

## 【0034】

哺乳類動物由来のプレセニリン-2 蛋白の全長は、例えば Science, 269, pp. 973-977, 1995 に記載されている。変異部位としては、第 141 番及び／又は 436 番が好ましく、マウス由来の配列においては N 141 I 及び／又は M 239 V がより好ましい。プレセニリン-1 蛋白及びプレセニリン蛋白-2 のいずれか片方、又は両者に変異が存在していてもよい。

## 【0035】

本発明の遺伝子変異動物は、その染色体 DNA 上に上記の変異プレセニリン-1 遺伝子及び／又は変異プレセニリン-2 遺伝子を有することを特徴としている。本発明の遺伝子変異動物は哺乳類動物であればよく、その種類は特に限定されないが、例えば、ゲッ歯類動物を好適に用いることができる。特に好ましいのはマウスである。本発明の遺伝子変異動物は、変異プレセニリン遺伝子を含む約 10 k b p 程度の配列を有する DNA を用いてプラスミドを作製し、そのプラスミドを胚性幹細胞に導入することにより、細胞内で相同組えを起こさせることにより作製することができる。

## 【0036】



本発明の遺伝子変異動物は、上記の変異プレセニリン-1 遺伝子及び／又は変異プレセニリン-2 遺伝子が相同組換えにより導入された結果、アミノ酸変異がほとんどの場合 1 個所で起こるという特徴がある。いわゆるトランスジェニック動物の場合には、変異部分の DNA 配列がランダムに染色体 DNA 上に挿入され、多くの場合、繰り返し配列の数十コピーが複数箇所に挿入されている。本発明の遺伝子変異動物ではこのような問題が回避されており、アルツハイマー病の病態を遺伝子レベルで正確に解析することが可能である。もっとも、本発明の遺伝子変異動物においてマーカー等を含む DNA を導入した場合は、そのマーカー部分及びマーカーを挿入するための配列などを含む場合もある。例えば、Sau3AI で切断可能な部位を挿入するために 1 塩基を置換することができ、PCR 産物を Sau3AI で切断して電気泳動等で確認することができる。

## 【0037】

本発明の遺伝子変異動物は、その遺伝子変異の結果、正常動物に比べて  $\beta$  アミロイド蛋白をより多量に生産するという特徴を有している。本発明の遺伝子変異動物により達成されるアミロイド  $\beta$  蛋白の増加量は特に限定されないが、例えば、記憶障害、病理所見、各種の神経障害の程度を評価した場合に正常動物との間で実質的な差異が認められる程度であることが好ましい。

## 【0038】

本発明により提供される DNA、プラスミド、培養細胞、及び哺乳類動物細胞の胚も同様に上記の変異プレセニリン-1 遺伝子及び／又は変異プレセニリン-2 遺伝子を有することにより特徴づけられる。例えば、変異プレセニリン-1 蛋白、好ましくは OS-2 型変異プレセリニン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子の cDNA 若しくは染色体 DNA の全長又は変異部分を含む DNA 配列；上記 cDNA 若しくは染色体 DNA の全長又は変異部分を含む DNA 配列に Sau3AI 部位を導入した DNA を含むプラスミド；OS-2 型変異プレセリニン-1 蛋白をコードする変異プレセニリン-1 遺伝子のエキソン 8 を含む染色体 DNA はいずれも本発明の範囲に包含される。また、これらの遺伝子又は DNA において 1 又は 2 個以上、好ましくは 1 個ないし 20 個、より好ましくは 1 個ないし数個の塩基が置換したものも本発明の範囲に包含される。

【0039】

本発明のDNA又はプラスミドの例としては、例えば、

①プレセニン-1の第213番のイソロイシンがスレオニンに置換した変異プレセニン-1蛋白をコードする変異プレセニン-1遺伝子からなるDNA、及び該DNAを含むプラスミド；

②変異プレセニン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番付近のアミノ酸をコードするDNA塩基配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGAT\_MGCCA\_NCCACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、NはT以外の塩基を意味し、MはT又はCを意味する。)である変異プレセニン-1遺伝子からなるDNA、又は該DNAを含むプラスミド；

③OS-2型変異変異プレセニン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番付近のアミノ酸をコードするDNA塩基配列が、次の配列：

5'-TGTGGTCGGGATGAT\_MGCCXYZCACTGGAAAGGCCC-3'

(ただし、MはT又はCを意味し、XYZはイソロイシン以外をコードする3塩基のコドンを意味する。)である変異プレセニン-1遺伝子からなるDNA、又は該DNAを含むプラスミド；

【0040】

④Sau3AI制限部位が導入された前記①～④のいずれかに記載のDNA、又は該DNAを含むプラスミド；

⑤プレセニン-1蛋白のアミノ酸配列中の第213番のイソロイシンがスレオニンに置換された変異プレセニン-1蛋白をコードする変異プレセニン-1の遺伝子のcDNA若しくは染色体DNAの全長又は変異部分を含んだ配列にSau3AI制限部位が導入されたDNA、又は該DNAを含むプラスミド；

⑥OS-2型変異マウスプレセニン-1蛋白をコードする変異マウスプレセニン-1遺伝子のエキソン8と、loxPではさまれたネオマイシン(neomycin)発現ユニットとを含むDNA、又は該DNAを含むプラスミド；並びに

⑦プレセニン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番のイソロイシンがスレオニンに置換した変異プレセニン-1蛋白をコードする変異プレセニン-1遺伝子のエキソン8と、loxPではさまれたネオマイシン(neomycin)発現ユニッ

トを含むDNA、又は該DNAを含むプラスミドなどを挙げるができるが、本発明の範囲はこれらの具体例に限定されることはない。

## 【0041】

本発明により提供される胚又は細胞としては、上記のプラスミド、例えばPRL-104又はPRL-105の塩基配列を有するプラスミドを挿入した胚又は細胞を挙げるができる。また、前記のプラスミドを用いた相同組換えにより、プレセニン-1蛋白のアミノ酸配列の第213番に変異を含む変異プレセニン-1蛋白をコードする遺伝子を導入した細胞は、本発明の好ましい細胞である。胚又は細胞は哺乳類動物由来であればその種類は特に限定されないが、ゲッ歯類動物由来、好ましくはマウス由来の胚又は細胞を用いることができる。

## 【0042】

## [遺伝子変異動物の作製]

ヒト変異プレセニリンをコードするDNAを入手した後に、本発明のプレセニリン遺伝子変異動物を以下に述べる工程に従って作製することができる。以下、哺乳類動物としてマウスを用い、ヒト変異プレセニリン遺伝子としてヒト・変異プレセニン-1遺伝子を用いる例について説明するが、本発明の遺伝子変異動物はこれらを用いて作製されるものに限定されることはない。また、この方法は本発明の遺伝子変異動物の作製方法の一例であり、本発明の遺伝子変異動物の作製方法は以下の方法に限定されることはない。ここに記載された一般的な方法及び実施例に記載された具体的な方法を参照することにより、また必要に応じてこれらの方法に適宜の修飾ないし改変を加えることにより、当業者は本発明の遺伝子変異動物を容易に作製することができる。

## 【0043】

まず、PCR法で用いるプローブを作製するために、マウス・ジェノミックDNAライブラリーから、作製しようとする変異動物のプレセニン-1遺伝子のエキソン8中の変異させる部位を含むDNA断片を得る。マウス・ジェノミックDNAライブラリーとしては、実施例で述べる129系統のマウスジェノミックDNAのほか、いかなる系統のマウスのジェノミックDNAライブラリーを用いてもよい

。変異を導入しようとする動物としてマウスを用いる場合には、マウス・プレセニリン-1 遺伝子のエキソン 8 を用いるが、他の種類の動物においては適宜の部分を選択する必要がある。

## 【0044】

つぎに、上記工程で作製した DNA 断片をランダムプライミングでラベル化(<sup>32</sup>P) した後、ラベル化したプローブを用いてジェノミクライブラリーをスクリーニングし、プレセニリン-1 遺伝子のエキソン 8 を含む染色体 DNA 断片をクローニングする。さらに、クローニングしたプレセニリン-1 遺伝子のエキソン 8 中の変異させる部分をサブクローニングした後に変異を導入する。

## 【0045】

変異を導入したマウス・プレセニリン-1 遺伝子のエキソン 8 を含む染色体 DNA を含むターゲッティングベクターを作製する。ターゲッティングベクターには、選択マーカーとして neo 発現ユニットを導入しておき、G418 (抗生物質) を培地に添加することにより、ベクターが染色体に導入されなかった細胞を死滅させるようにしておく。このターゲッティングベクターをエレクトロポレーション法や遺伝子を細胞内に導入する他の方法によって ES 細胞に導入した後、G418 存在下で ES 細胞を培養し、出現してくるコロニーを採取する。得られたコロニーを二つに分け、一つは培養・継代あるいは凍結により保存しておき、他の一つを使用して相同組換えにより目的とするマウス・プレセニリン-1 遺伝子のエキソン 8 の変異が導入された ES 細胞を調べる。目的とする変異が導入された ES 細胞のコロニーの保存してある分を取り出して以下の工程に用いる。

## 【0046】

別途、妊娠マウスから 8 細胞期胚を取り出し、上記の保存してあった約 20 個位の ES 細胞をまぶした後、偽妊娠させたメスマウスの子宮に導入する。生まれてきた仔の中から毛色がキメラのマウスを選択する。キメラマウスを C57BL/6 系統と交配させ、生まれてきた仔の中から毛色がアグチのものを選択することにより、目的とする変異の入ったマウスを取得することができる。なお、このマウスは変異の入ったプレセニリン-1 遺伝子に関してはヘテロであり、もう 1 本の染色体にあるプレセニリン-1 遺伝子は変異のない野生型である。

## 【0047】

マウス・プレセニリン-1 遺伝子のエキソン 8 を含む染色体 DNA をマウス・ジェノミック DNA ライブラリーからクローニングするためのプローブを作製するための出発材料としては、実施例に具体的に述べる方法のほか、塩基配列が明らかにされているマウスやヒト等の他の哺乳類動物由来のプレセニリン-1 遺伝子の cDNA を用いてもよい。プローブとなる DNA 断片を得る方法としては、実施例に述べる PCR 法による増幅法のほか、染色体 DNA のマウス・プレセニリン-1 遺伝子のエキソン 8 に対応する部分を含むマウス染色体 DNA、又は塩基配列が明らかにされているマウスやヒト等の他の哺乳類動物由来のプレセニリン-1 遺伝子の cDNA を含むプラスミドを大量に調製する方法などを採用することができる。また、このプラスミドを制限酵素で切断した後、アガロースゲル電気泳動等の手段を用いて DNA 断片として必要な部分を分取することによっても目的の DNA 断片を得ることができる。

## 【0048】

DNA 断片をラベル化する方法としては、実施例に述べるランダムプライミング法のほか、 $^{32}\text{P}$ -dNTP 存在下に PCR を行う方法などを用いることができる。また、予めラベルしたオリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして使用することにより、PCR 法あるいはランダムプライミング法でラベル化してもよい。ラベル化には、実施例に示すラジオアイソトープのほか、ビオチン-アビジン (Biotin-Avidin) 系あるいはアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase) 等を用いる化学発光法も利用できる。また、T3 又は T7 RNA ポリメラーゼを用いてラベルした RNA 断片をプローブとして使用できる。この他、プローブを作製する方法は種々知られておりが、いかなる方法を採用して目的とするプローブを取得してもよい。

## 【0049】

目的とする変異を DNA に導入する方法としては、実施例に具体的に示した方法のほか、M13 等のファージ由来のプラスミド又は  $\text{ung}^-$  大腸菌を用いて複製したプラスミドを用いて、目的の変異を導入したい部分に変異を導入するために合成したオリゴデオキシヌクレオチドを相補的に (変異導入部位の塩基のみは相補

的ではない) 結合させ、これをプライマーとしてDNA ポリメラーゼでヘテロな二本鎖DNA プラスミドを作製し、このプラスミドで大腸菌( $ung^+$ ) を形質転換することにより目的の変異を持ったプラスミドを取得することができる。また、目的とする変異を導入するために塩基を変更してあり、かつ互いに相補的にアニールすることができ、両端に制限酵素部位が生じるように設計された二本のオリゴデオキシヌクレオチドを合成し、変異を導入すべきプラスミドにDNA リガーゼを用いて結合させる方法(カセット法)を採用して、目的の変異を持ったプラスミドを取得することもできる。これらの方法を目的に応じて適宜修飾ないし改良することにより、一層効率的に目的を達成できる場合がある。これらの他、変異を導入する方法は当業界で利用可能な種々の変異導入法が知られており、いずれの方法によっても目的を達成できる。

#### 【0050】

ターゲッティングベクターは、変異を導入したマウス染色体DNA断片、選択マーカーをコードするDNA断片、これの転写を制御するためのプロモーター、及びターミネ이터を含む選択マーカー発現ユニットを必須要素として含んでいることが好ましい。変異を導入したマウス染色体DNA断片は、ES細胞内で相同組換えを起こすために必要な部分であり、変異を導入した箇所を挟んで前後のマウス染色体DNA断片が必要である。すなわち、ターゲッティングベクターは、変異させた塩基のみが本来のマウス染色体DNAとは異なるDNA断片を持っている。その断片の長さは10 kbp程度が好ましいが、一般的には多少の長さの増減は許容される。もっとも、あまりに短い場合には、ES細胞内での相同組換えの頻度が低下する場合がある。

#### 【0051】

選択マーカーとしては、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子等のポジティブ選択マーカー、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリア毒素Aフラグメント等のネガティブ選択マーカーなどが知られており、培養細胞株の選択マーカーとして使用されている選択マーカーはES細胞において何れも使用することができる。ネガティブ選択マーカーを使用する場合は、ターゲッティングベクターのマウス染色体DNA断片の外に挿入することが必

要であり、ポジティブ選択マーカを使用する場合は、その発現ユニットをターゲティングベクターのマウス染色体DNA断片の中のイントロン中に挿入することが必要である。ポジティブ選択マーカをエキソン中に挿入すると、挿入された遺伝子は機能を失うのが通常であり、最終目的である変異の影響を調べるために作製するマウスを得ることができない場合がある。

## 【0052】

ES細胞株としては129系統のマウス由来の株が多く使用されているが、この系統のES細胞としては、実施例で述べるR1のほか、D3、CCE、J1、AB1などのES細胞を用いてもよい。また、例えばC57BL/6系統のマウス等、129系統以外マウス由来のES細胞も使用できる。ES細胞にターゲティングベクターを導入する方法としては、実施例で述べるエレクトロポレーション法が一般的であるが、リン酸カルシウム共沈法やリポソーム法など、培養細胞株へのプラスミド導入に利用可能な方法であれば何れの方法を採用してもよい。ターゲティングベクター導入後のES細胞を選択マーカ存在下で培養すると、生き残ってコロニーを形成するES細胞は相同組換えを起こしている可能性がある。これらのコロニーを形成したES細胞の中から相同組換えを起こしている細胞を調べる方法としては一般的にはPCR法が用いられるが、プローブとして使用できるDNA断片、RNA断片、合成オリゴデオキシヌクレオチド、又は抗体などを使用することも可能である。

## 【0053】

ES細胞を発生初期の受精卵に混入させた後、発生を継続させ、精子あるいは卵子がES細胞由来のマウスを得ることができる。相同組換えを起こしたES細胞を発生初期の受精卵に混入させる方法としては、実施例に述べる方法のほか、胎胚期の受精卵を妊娠マウスより取り出し、これに注入用ピペットで10～20個のES細胞を注入した後、偽妊娠させたメスマウスの子宮に移植することにより発生を継続させて仔を得る方法などを採用することができる。

## 【0054】

ES細胞を混入させる際に使用する発生初期の受精卵はいずれの系統のマウスから採取したものでもよいが、混入させたES細胞が生まれた仔に取り込まれている

かどうか分かりやすいように、ES細胞の元になっている系統のマウスとは毛色の異なる系統のマウスの受精卵を使用するのが好ましい。例えば、実施例において使用したES細胞はアグチ色（agouti色、淡褐色）の129 系統であり、受精卵が由来するマウス（C57BL/6 系統）は黒色の系統である。これらを用いて生まれてきた仔の中からキメラの毛色をしている仔を選択することにより、ES細胞由来の細胞を持っている仔を容易に選択することが可能である。この場合、agouti色の割合の多い仔ほど生殖細胞がES細胞由来となっている可能性が高い。なお、偽妊娠させるマウスはどの系統のマウスでもよい。

#### 【0055】

得られたキメラマウスを交配させて目的とする変異導入マウスを取得するために使用するマウスも、ES細胞の元になっている系統のマウスと毛色の異なる系統のマウスを使用するのが好ましい。通常、キメラマウスのオスと他系統のメスを交配させ、アグチ色の仔を得ればそれが目的とする変異をヘテロの状態で持っているマウスである。OS-2型変異のPS-1遺伝子を持つマウスは、lox P 配列で挟まれたneo 発現ユニットをもっているため、cre 遺伝子導入トランスジェニックマウスとの交配によりneo 発現ユニットが取り除かれたマウスを得ることができる。

#### 【0056】

本発明の遺伝子変異動物、変異プレセニリン遺伝子を導入した細胞、変異プレセニリン遺伝子を含むプラスミド等を用いて、アルツハイマー病の予防及び／又は治療に有用な物質をスクリーニングし、その有用性を評価することができる。健常な哺乳類動物ではアミロイド $\beta$ の蓄積は極めて徐々に生じるが、本発明の遺伝子変異動物は、アミロイド $\beta$ の産生が多いという特徴を有している。従って、本発明の遺伝子変異動物に種々の被検物質を投与し、非投与群の動物又は対照物質投与動物と比較することにより、アルツハイマー病の予防及び／又は治療に有用な物質を評価することができる。評価の代表例として被検物質のスクリーニングを挙げることができ、試験項目としては、症状、病理所見、薬理試験等を採用することができる。

#### 【0057】



また、本発明の細胞を用いる場合には、本発明の動物から分離して初代培養細胞として用いることができるほか、その初代培養細胞をウイルス等で不死化した後、継代培養して数日毎に当該培養細胞の一部を取り出して再び新しい組織培養液で培養することにより、当該細胞を安定して継代培養細胞とすることができる。なお、本発明の細胞には、遺伝子変異動物から分離した神経細胞などの初代細胞のほか、初代細胞を継代培養していわゆるライン化された継代培養細胞も包含される。本発明の細胞として神経細胞を用いる場合には、細胞が変異プレセニリン-1 蛋白を発現する結果としてアミロイドβ 蛋白が多量に発現される。このような神経細胞のインビトロの培養系に被検物質を添加した後、例えば細胞の生存期間や一定期間経過後の生細胞数などを比較することにより、アミロイドβ 蛋白の蓄積が関与する神経細胞死を予防又は遅延させる物質をスクリーニングし、その有用性を評価することができる。

【0058】

#### 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの例に限定されることはない。実施例中、プレセニリン-1 遺伝子をPS-1 と略する場合がある。

#### 例1：マウスPS-1遺伝子のエキソン8を含む染色体DNAのクローニング

マウスPS1 遺伝子のエキソン8を含む染色体DNA断片取得用のプローブ作製のため、まず下記の2本のオリゴデオキシヌクレオチドを合成した。

PR-8-U: 5'-GGAA TTTTGGTGTGGTCGGGATGAT-3' (25mer)

PR-8-L: 5'-GGTCCATTTCGGGGAGGTACTTGA-3' (23mer)

この2本のオリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、129SVJマウスジェノミックライブラリー(Stratagene社製)より抽出したDNAを用いてPCRを行い、得られた約130bpの増幅されたDNA断片を得た。この断片を32P-dCTP存在下、ランダムプライムラベル法によりラベルしたものをプローブとし、129SVJマウスジェノミックライブラリーをスクリーニングした。得られた陽性ファージクローンの塩基配列を調べ、目的とするマウスPS-1遺伝子のエキソン8を含む染色体DNAを持ったクローンであること確認した。

このクローニングした染色体DNAをP $\alpha$ とし、その制限酵素地図を作製した（図1）。

【0059】

例2：突然変異導入用プラスミドの作製：

P $\alpha$ を持つクローン化したファージよりDNAを抽出し、Sal Iで切断後、1.0%アガロースゲル電気泳動を行い、P $\alpha$ を回収した。P $\alpha$ をPst IおよびXba Iで切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、マウスPS1の第213番目のアミノ酸であるイソロイシンをコードしている塩基を含む約600bpのDNA断片を回収し、これをX-1とした。X-1を予めPst IおよびXba Iで切断したプラスミドpBluescript II KS+（Stratagene社製）とT4リガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換してプラスミドpX-1を得た。

【0060】

例3：OS-2型突然変異の導入：

プラスミドpX-1に下記の2本のオリゴデオキシヌクレオチドPRL-104 および PRL-105を用いて、OS-2型突然変異および制限酵素Sau3AI部位を新たに導入した。なお、PRL-104 およびPRL-105 は何れも36mer で互いに相補性となっている。

PRL-104 : 5'-TGTGGTCGGGA TGATC\* GCCAC CCACTGGAAAGGCCC-3'

PRL-105 : 5'-GGGCCTTTCCAGTGG G TGGCG\* ATCATCCCGACCACA-3'

（下線を付した塩基はOS-2型変異導入のため本来の塩基を変異させてある：PRL-104 では本来はT、PRL-105 では本来はA である。また、アスタリスクを付した塩基はSau3AI部位導入のため本来の塩基を変異させてある：PRL-104 では本来はT、PRL-105 では本来はA である）。

【0061】

変異の導入はQUICK CHANGE SITE-DIRECTED MUTAGENESISKIT（Stragene社製）を使用し、同社のプロトコールに従って実施した。変異が正しく導入されていることを塩基配列を調べることにより確認し、この変異を持ったX-1 をmX-1とし、mX-1を持つプラスミドをp mX-1とした（図2）

【0062】

例4：OS-2型変異を持った染色体DNAの作製

例 1 で得たマウス PS-1 のエキソン 8 を含む P $\alpha$  を Nco I で切断後、4 種類の dNTPs 存在下、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端とした。ついで、Asp718I で切断後、1% アガロースゲル電気泳動を行い、エキソン 8 を含む約 5 kbp の DNA 断片を回収した。この DNA 断片を、予め Sma I および Asp718 I で切断したプラスミド pBluescript II KS + と T4 DNA リガーゼで結合し、大腸菌を形質転換してプラスミド pSB-0 を得た。pSB-0 を Xba I で完全に切断した後、Pst I で部分消化を行った。一方、pmX-1 を Xba I および Pst I で切断した後、1% アガロースゲル電気泳動を行い mX-1 を回収した。上記の上記の Pst I 断片に mX-1 を T4 DNA リガーゼで結合させ、大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌のコロニーを調べ、プラスミド pSB-0 の X-1 部分が mX-1 と置換されているプラスミドを持つコロニーを選択し、回収したプラスミドを pmSB-0 とした (図 3)。

【0063】

また、P $\alpha$  を BamH I および Sal I で切断後、1% アガロースゲル電気泳動を行い、約 7 kbp のエキソン 8 を含む DNA 断片を回収した。予め Bam H I および Sal I で切断した pBluescript II KS+ をこの断片に T4 DNA リガーゼで結合させ、大腸菌を形質転換してプラスミド pSB-1 を得た。pmSB-0 を Nco I で切断後、4 種の dNTPs 存在下 T4DNA ポリメラーゼで平滑末端化し、更に XbaI で切断後、1% アガロースゲル電気泳動を行った。回収したエキソン 8 を含む約 2.2 kbp の DNA 断片 XN と pSB-1 を Xba I および Pst I で切断後、1% アガロースゲル電気泳動を行った。回収したエキソン 8 を含まない約 2.3 kbp の DNA 断片 PX を T4 DNA リガーゼで結合させた。これを、予め Xba I で切断してから 4 種の dNTPs 存在下 T4DNA ポリメラーゼで平滑末端化した後 T4 DNA リガーゼで再結合させ、更に、Sma I および Pst I で切断したプラスミド pBluescript II KS + と T4 DNA リガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌のコロニーを調べ、DNA 断片 NX と XP が Xba I 部位で結合した DNA 断片を 1 個だけ含むプラスミド pmSB-0' を得た (図 4)

【0064】

例 5 : ターゲッティングベクターの基本骨格の作製

プラスミド pmSB-0' を Xba I 部位に Eag I 部位を導入するため次の塩基配列を

持つオリゴデオキシヌクレオチドを合成した。

5'-CTAGACGGCCGT-3' (12 mer)

このオリゴデオキシヌクレオチドは CGGCCG 部分の相補性を持つ塩基配列を介してアニールすることができ、Xba I で切断した部位に挿入すると以下のようになる。

【表 1】

5'-TCTAGACGGCCGTCTAGA-3'
3'-AGATCTGCCGGCAGATCT-5'
<div style="display: inline-block; width: 30%; text-align: center;">Xba I</div> <div style="display: inline-block; width: 30%; text-align: center;">Eag I</div> <div style="display: inline-block; width: 30%; text-align: center;">Xba I</div>

【0065】

プラスミド pmSB-0' を Xba I で切断後、このオリゴデオキシヌクレオチドを加え T4 DNA リガーゼで結合させ、大腸菌を形質転換し、プラスミド pmSB-0' の Xba I 部位に Eag I 部位が挿入されたプラスミド pmSB-0' eag を得た。この pmSB-0' eag を Nco I および Sal I で切断後、1% アガロースゲル電気泳動を行い、エキソン 8 を含む約 5.3 kbp の DNA 断片 SN を回収した。また、pSB-1 を BamH I および Nco I で切断後、1% アガロースゲル電気泳動を行い、エキソン 8 を含まない約 2 kbp の DNA 断片 NB を回収した。SN および NB を T4 DNA リガーゼで結合させ、BamH I および Sal I で処理することにより、両 DNA 断片が Nco I 部位で結合した DNA 断片を得た。この DNA 断片を、予め、Not I で切断後 マングビーンヌクレアーゼ処理により平滑末端化し、T4 DNA リガーゼで再結合させることにより Not I 部位およびそれに重なっている Eag I 部位を壊し、さらに BamH I および Sal I で切断したプラスミド pBluescript II KS + と T4 DNA リガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換してプラスミド pA を得た (図 5)。

【0066】

例 6 : ターゲッティングベクターの作製

プラスミド pPNT (Victor L.J. 等 : Cell 65 巻、1153 頁、1991 年) を Xho I および BamH I で切断後 T4 DNA ポリメラーゼを用いて平滑末端化し、1% アガロースゲル電気泳動を行った。回収した neo 発現ユニットを含む約 1.7 kbp の DNA 断

片を、予めBam H Iで切断後T4 DNAポリメラーゼを用いて平滑末端化したプラスミドpBS246（ギブコBRL社製）に対してT4 DNAリガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換してプラスミドpBS246neoを得た。このプラスミドをNot Iで切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、loxP配列に挟まれたneo発現ユニットを持つ約2 kbpのDNA断片を回収した。このDNA断片を、予めEag Iで切断したpAとT4 DNAリガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌のコロニーを調べ、neo遺伝子の方向がPS-1遺伝子と同方向になっているプラスミドpBを得た（図6）。

#### 【0067】

pBをBamH IおよびSal Iで切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、OS-2型変異を持ち、かつloxP配列に挟まれたneo発現ユニットを持つDNA断片Cを回収した。また、P $\alpha$ をSal IおよびBamH Iで切断して得た約6.5 kbpのDNA断片をpBluescript II KS+へサブクローニングして得たプラスミドpSB-2を、Hind IIIおよびBamH Iで切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、約4 kbpのDNA断片Dを回収した。DNA断片CおよびDをT4 DNAリガーゼを用いて結合させた後、Hind IIIおよびSal Iで切断し、DNA断片CとDがBamH I部位で結合したDNA断片を得た。このDNA断片を、予めHind IIIおよびSal Iで切断したpBluescript II KS+とT4 DNAリガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換し、ターゲッティングベクターpOS-2neoloxPを得た（図7）。

#### 【0068】

##### 例7：ES細胞へのターゲッティングベクターの導入

以下の実施例で記載する細胞の培養は、全て37℃の5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中で行った。15% FBSおよび10<sup>3</sup> units/mlのLIF（ESGRO社製）を添加したDMEM培地（以下ES用培地）で維持しているES細胞R1に対して、electroporation法によりターゲッティングベクターの導入を行った。electroporationを実施する前日に新鮮なES用培地と交換したR1細胞を集め、electroporation用溶液（20 mM HEPES, pH 7.05, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 mM dextrose）で洗浄した。10<sup>7</sup>個のR1細胞を、Not Iで線状化した25  $\mu$ gの

ターゲッティングベクター pOS-2neoloxP と0.8 mlのelectroporation 用溶液を用い、electroporation 用キュベット中で混合した。1～2分後、Bio-Rad Gene Pulser (バイオラッド社製) を使用してパルスを与えた (パルス条件: 240V, 500  $\mu$  F)。遠心分離によりES細胞を回収し、30 ml のES用培地に懸濁した。予め8 ml のES用培地中にフィーダー細胞を播いてある10 mlディッシュ1枚当たりこのES細胞懸濁液2 ml を加え、12～18時間後に力価150  $\mu$ g/mlのG418を添加して、1週間培養した。なお、フィーダー細胞としては、本発明者がHS1ノックアウトマウス (I. Taniuchi 等; EMBO J. 14巻、3664頁、1995年) の雄と野性型のICR 系統の雌を交配し、12～13日胚から分離して樹立した線維芽細胞を使用した。

【0069】

例8: 相同組換えを起こしたES細胞の取得

例7において、G418の添加後1週間培養して生じてきたES細胞のコロニーを採取した。各コロニーを二分し、一つは培養を継続した。もう一つは相同組換えを起こしているクローンを選択するためPBSで洗浄し、Proteinase K処理を行った後、染色体DNA を回収してPCR によりクローンを選択した。PCRにおいて用いた合成プライマーの塩基配列は次の通りである。

Prsn1-2 : 5'-CCCAACTCTATTTCTACCCCTCGTTCATCTG-3'

(構築したターゲッティングベクターの外側に有る塩基配列)

PKG-1 : 5'-TAGTGAGACGTGCTACTTCCATTTGTCACG-3'

(neo 発現ユニット中の塩基配列)

【0070】

PCR の実験条件は、93℃で30秒、60℃で1分、68<sup>0</sup>℃で3分を1サイクルとして35サイクル行い、PCR 産物の1%アガロースゲル電気泳動を行い、予想される位置にバンドを生じたクローンを陽性と判断した。ここで陽性と判断されたクローンはオリゴデオキシヌクレオチドPRL-101 およびPRL-102 を用いた PCRを行い、PCR 産物をSau3AIで切断した後、2%アガロースゲル電気泳動を行い、バンドが二分されていることから変異が導入されていることを確認して正しく相同組換えを起こしたES細胞を選択した。

PRL-101 およびPRL-102 の塩基配列は次の通りである。

PRL-101 : 5'-TGCTGGAGGAAAATGTGTTATTTAAGAGCA-3'

PRL-102 : 5'-TACTGAAATCACAGCCAAGATGAGCCATGC-3'

【0071】

例9：ノックインマウスの取得：

相同組換えを起こしていることが確認されたES細胞の培養を4日間継続した後、細胞をトリプシン処理によりバラバラに分散した。マウスBDF1系統の雄を掛け合わせた同系統の雌より8細胞期胚を取り出し、透明帯を外した後、バラバラにした上記ES細胞を接着させた（20ES細胞／8細胞期胚1個）。これを偽妊娠処理した雌マウスの子宮に移し、胎児の発生を継続させることによりキメラマウスを得た。このキメラマウスの雄をC57BL/6の雌と交配し、生まれた仔のうちagoutiのものを選り、その尾の一部を切断した試料から染色体DNAを抽出した。PRL-101 およびPRL-102 を用いてPCRを行った後、Sau3AIでPCR産物を切断し、2%アガロースゲル電気泳動を行い、切断されたバンドの存在を調べることによりOS-2型変異を持っていることを確認した。確認されたマウスのうち雄を一匹選り#2とした。

【0072】

例10

例9で得られたノックインマウス#2はターゲッティングベクター由来のloxPで挟まれたneo発現ユニットをヘテロの状態で有している。このマウス#2（雄、約4ヶ月齢）をCAG-cre#13(K. Sakai 等; Biochem. Biophys. Res. Commun. 217:318, 1997) タランスゲニックマウスのF4の雌（2ヶ月齢：導入したcre遺伝子はヘテロの状態となっている。）と交配し、例8で述べた条件でオリゴデオキシヌクロチドPRL-100, PRL-102 及びPGK-1 を用いて、PCRを行い、neo発現ユニットが除かれたマウスを選択することにより、neo発現ユニットを持たないOS-2型変異のノックインマウスを取得した（図8）。本マウスはOS-2型変異に関してヘテロであり、また、一つのloxPを保持している。なお、PCRに使用したPRL-100、PRL-102 及びPGK-1 の塩基配列は以下のとおりである。

PRL-100: 5'-GGT CCA TCC CAG CTT CAC ACA GAC AAG TCT-3'

PRL-102: 5'-TAC TGA AAT CAC AGC CAA GAT GAG CCA TGC-3'

PKG-1: 5'-TAG TGA GAC GTG CTA CTT CCA TTT GTC ACG-3'

【0073】

【発明の効果】

本発明の遺伝子変異動物は、変異プレセリニン-1 遺伝子を有するために、正常動物（その変異を持たない動物）に比較してアミロイドβの生産量が多く、大脑海馬神経細胞死や脱落が早期に起こりアルツハイマー症状を呈する。従って、本発明の遺伝子変異動物を用いて、アルツハイマー病の予防及び／又は治療に有用な物質のスクリーニングなどを行うことができ、有用性の評価を行うことができる。



【0074】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：467

配列の型： アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列

Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln 15

ATG ACA GAG TTA CCT GCA CCG TTG TCC TAC TTC CAG AAT GCA CAG

Met Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Val Arg Ser Gln Asn 30

ATG TCT GAG GAC AAC CAC CTG AGC AAT ACT GTA CGT AGC CAG AAT

Asp Asn Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly 45

GAC AAT AGA GAA CGG CAG GAG CAC AAC GAC AGA CGG AGC CTT GGC

His Pro Glu Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg 60

CAC CCT GAG CCA TTA TCT AAT GGA CGA CCC CAG GGT AAC TCC CGG

Gln Val Val Glu Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu 75

CAG GTG GTG GAG CAA GAT GAG GAA GAA GAT GAG GAG CTG ACA TTG

Lys Tyr Gly Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr 90

AAA TAT GGC GCC AAG CAT GTG ATC ATG CTC TTT GTC CCT GTG ACT

Leu Cys Met Val Val Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe 105

CTC TGC ATG GTG GTG GTC GTG GCT ACC ATT AAG TCA GTC AGC TTT

Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu 120

TAT ACC CGG AAG GAT GGG CAG CTA ATC TAT ACC CCA TTC ACA GAA

Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg Ala Leu His Ser Ile Leu Asn 135

GAT ACC GAG ACT GTG GGC CAG AGA GCC CTG CAC TCA ATT CTG AAT

Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val Val Met Thr Ile Leu Leu 150

GCT GCC ATC ATG ATC AGT GTC ATT GTT GTC ATG ACT ATC CTC CTG

Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys Val Ile His Ala Trp 165

GTG GTT CTG TAT AAA TAC AGG TGC TAT AAG GTC ATC CAT GCC TGG

Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe Phe Ser Phe Ile 180

CTT ATT ATA TCA TCT CTA TTG TTG CTG TTC TTT TTT TCA TTC ATT

Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala Val Asp Tyr 195

TAC TTG GGG GAA GTG TTT AAA ACC TAT AAC GTT GCT GTG GAC TAC

Ile Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly Val Val Gly Met 210

ATT ACT GTT GCA CTC CTG ATC TGG AAT TTT GGT GTG GTG GGA ATG

Ile Ser Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala Tyr 225

ATT TCC ATT CAC TGG AAA GGT CCA CTT CGA CTC CAG CAG GCA TAT

Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr 240

CTC ATT ATG ATT AGT GCC CTC ATG GCC CTG GTG TTT ATC AAG TAC

Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val 255

CTC CCT GAA TGG ACT GCG TGG CTC ATC TTG GCT GTG ATT TCA GTA

Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met 270  
TAT GAT TTA GTG GCT GTT TTG TGT CCG AAA GGT CCA CTT CGT ATG

Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala 285  
CTG GTT GAA ACA GCT CAG GAG AGA AAT GAA ACG CTT TTT CCA GCT

Leu Ile Tyr Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu 300  
CTC ATT TAC TCC TCA ACA ATG GTG TGG TTG GTG AAT ATG GCA GAA

Gly Asp Pro Glu Ala Gln Arg Arg Val Ser Lys Asn Ser Lys Tyr 315  
GGA GAC CCG GAA GCT CAA AGG AGA GTA TCC AAA AAT TCC AAG TAT

Asn Ala Glu Ser Thr Glu Arg Glu Ser Gln Asp Thr Val Ala Glu 330  
AAT GCA GAA AGC ACA GAA AGG GAG TCA CAA GAC ACT GTT GCA GAG

Asn Asp Asp Gly Gly Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp 345  
AAT GAT GAT GGC GGG TTC AGT GAG GAA TGG GAA GCC CAG AGG GAC

Ser His Leu Gly Pro His Arg Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala 360  
AGT CAT CTA GGG CCT CAT CGC TCT ACA CCT GAG TCA CGA GCT GCT

Val Gln Glu Leu Ser Ser Ser Ile Leu Ala Gly Glu Asp Pro Glu 375  
GTC CAG GAA CTT TCC AGC AGT ATC CTC GCT GGT GAA GAC CCA GAG

Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile Phe Tyr Ser 390  
GAA AGG GGA GTA AAA CTT GGA TTG GGA GAT TTC ATT TTC TAC AGT

Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Asp Trp Asn 405

GTT CTG GTT GGT AAA GCC TCA GCA ACA GCC AGT GGA GAC TGG AAC

Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys Leu 420

ACA ACC ATA GCC TGT TTC GTA GCC ATA TTA ATT GGT TTG TGC CTT

Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala Leu Pro Ala Leu 435

ACA TTA TTA CTC CTT GCC ATT TTC AAG AAA GCA TTG CCA GCT CTT

Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe Ala Thr Asp 450

CCA ATC TCC ATC ACC TTT GGG CTT GTT TTC TAC TTT GCC ACA GAT

Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His Gln Phe 465

TAT CTT GTA CAG CCT TTT ATG GAC CAA TTA GCA TTC CAT CAA TTT

Tyr Ile \*\*\* 467

TAT ATC TAG

配列番号 : 2

配列の長さ : 467

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列

Met Thr Glu Ile Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln 15

ATG ACA GAG ATA CCT GCA CCT TTG TCC TAC TTC CAG AAT GCC CAG

Met Ser Glu Asp Ser His Ser Ser Ser Ala Ile Arg Ser Gln Asn 30

ATG TCT GAG GAC AGC CAC TCC AGC AGC GCC ATC CGG AGC CAG AAT

Asp Ser Gln Glu Arg Gln Gln Gln His Asp Arg Gln Arg Leu Asp 45

GAC AGC CAA GAA CGG CAG CAG CAG CAT GAC AGG CAG AGA CTT GAC

Asn Pro Glu Pro Ile Ser Asn Gly Arg Pro Gln Ser Asn Ser Arg 60

AAC CCT GAG CCA ATA TCT AAT GGG CGG CCC CAG AGT AAC TCA AGA

Gln Val Val Glu Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu 75

CAG GTG GTG GAA CAA GAT GAG GAG GAA GAC GAA GAG CTG ACA TTG

Lys Tyr Gly Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr 90

AAA TAT GGA GCC AAG CAT GTC ATC ATG CTC TTT GTC CCC GTG ACC

Leu Cys Met Val Val Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe 105

CTC TGC ATG GTC GTC GTC GTG GCC ACC ATC AAA TCA GTC AGC TTC

Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu 120

TAT ACC CGG AAG GAC GGT CAG CTA ATC TAC ACC CCA TTC ACA GAA

Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg Ala Leu His Ser Ile Leu Asn 135

GAC ACT GAG ACT GTA GGC CAA AGA GCC CTG CAC TCG ATC CTG AAT

Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val Ile Met Thr Ile Leu Leu 150

GCG GCC ATC ATG ATC AGT GTC ATT GTC ATT ATG ACC ATC CTC CTG

Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys Val Ile His Ala Trp 165

GTG GTC CTG TAT AAA TAC AGG TGC TAC AAG GTC ATC CAC GCC TGG

Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe Phe Ser Phe Ile 180

CTT ATT ATT TCA TCT CTG TTG TTG CTG TTC TTT TTT TCG TTC ATT

Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala Val Asp Tyr 195

TAC TTA GGG GAA GTA TTT AAG ACC TAC AAT GTC GCC GTG GAC TAC

Val Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly Val Val Gly Met 210

GTT ACA GTA GCA CTC CTA ATC TGG AAT TTT GGT GTG GTC GGG ATG

Ile Ala Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala Tyr 225

ATT GCC ATC CAC TGG AAA GGC CCC CTT CGA CTG CAG CAG GCG TAT

Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr 240

CTC ATT ATG ATC AGT GCC CTC ATG GCC CTG GTA TTT ATC AAG TAC

Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val 255

CTC CCC GAA TGG ACC GCA TGG CTC ATC TTG GCT GTG ATT TCA GTA

Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met 270

TAT GAT TTG GTG GCT GTT TTA TGT CCC AAA GGC CCA CTT CGT ATG

Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala 285

CTG GTT GAA ACA GCT CAG GAA AGA AAT GAG ACT CTC TTT CCA GCT

Leu Ile Tyr Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu 300

CTT ATC TAT TCC TCA ACA ATG GTG TGG TTG GTG AAT ATG GCT GAA

Gly Asp Pro Glu Ala Gln Arg Arg Val Pro Lys Asn Pro Lys Tyr 315

GGA GAC CCA GAA GCC CAA AGG AGG GTA CCC AAG AAC CCC AAG TAT

Asn Thr Gln Arg Ala Glu Arg Glu Thr Gln Asp Ser Gly Ser Gly 330

AAC ACA CAA AGA GCG GAG AGA GAG ACA CAG GAC AGT GGT TCT GGG

Asn Asp Asp Gly Gly Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp 345  
AAC GAT GAT GGT GGC TTC AGT GAG GAG TGG GAG GCC CAA AGA GAC

Ser His Leu Gly Pro His Arg Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala 360  
AGT CAC CTG GGG CCT CAT CGC TCC ACT CCC GAG TCA AGA GCT GCT

Val Gln Glu Leu Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ser Glu Asp Pro Glu 375  
GTC CAG GAA CTT TCT GGG AGC ATT CTA ACG AGT GAA GAC CCG GAG

Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile Phe Tyr Ser 390  
GAA AGA GGA GTA AAA CTT GGA CTG GGA GAT TTC ATT TTC TAC AGT

Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Asp Trp Asn 405  
GTT CTG GTT GGT AAG GCC TCA GCA ACC GCC AGT GGA GAC TGG AAC

Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys Leu 420  
ACA ACC ATA GCC TGC TTT GTA GCC ATA CTG ATC GGC CTG TGC CTT

Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala Leu Pro Ala Leu 435  
ACA TTA CTC CTG CTC GCC ATT TTC AAG AAA GCG TTG CCA GCC CTC

Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe Ala Thr Asp 450  
CCC ATC TCC ATC ACC TTC GGG CTC GTG TTC TAC TTC GCC ACG GAT

Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His Gln Phe 465  
TAC CTT GTG CAG CCC TTC ATG GAC CAA CTT GCA TTC CAT CAG TTT

Tyr Ile \*\*\* 467

TAT ATC TAG

【図面の簡単な説明】

【図1】 マウス・ジェノミックDNAライブラリーよりクローニングして得たマウスプレセニリン-1のエキソン8を含む染色体DNA断片Pαの制限酵素地図である。

【図2】 部位特異的変異導入法によりOS-2型変異が導入された部位を含むマウスプレセニリン-1遺伝子のエキソン8の一部を持つプラスミドpMX-1の作製方法の工程を示した図である。

【図3】 ターゲッティングベクターの作製の工程を示した図である。

【図4】 ターゲッティングベクターの作製の工程を示した図である。

【図5】 ターゲッティングベクターの作製の工程を示した図である。

【図6】 ターゲッティングベクターの作製の工程を示した図である。

【図7】 ターゲッティングベクターの作製の工程と、ターゲッティングベクターpOS-2neoIoxPの構造を示した図である。

【図8】 OS-2型変異プレセニリン-1遺伝子をもつ#2マウス（雄）とCAG-cre #13マウスのF4（雌）を交配して得られた仔の尾の一部を切断した試料から得られた染色体DNAを、例10に記載した方法でPCRを行った産物の1%アガロースゲル電気泳動の結果を示した図である。右側から2番目と4番目のマウスは染色体DNA上にneo発現ユニットをもっていないことが示されている。図中、最左端のレーンは分子量マーカーである。[A]は、染色体DNA上のneoを欠損していることをバンドであり、[B]は染色体DNAが野生型であることを示すバンドであり、[C]は染色体DNA上のneo存在していることを示すバンドである。



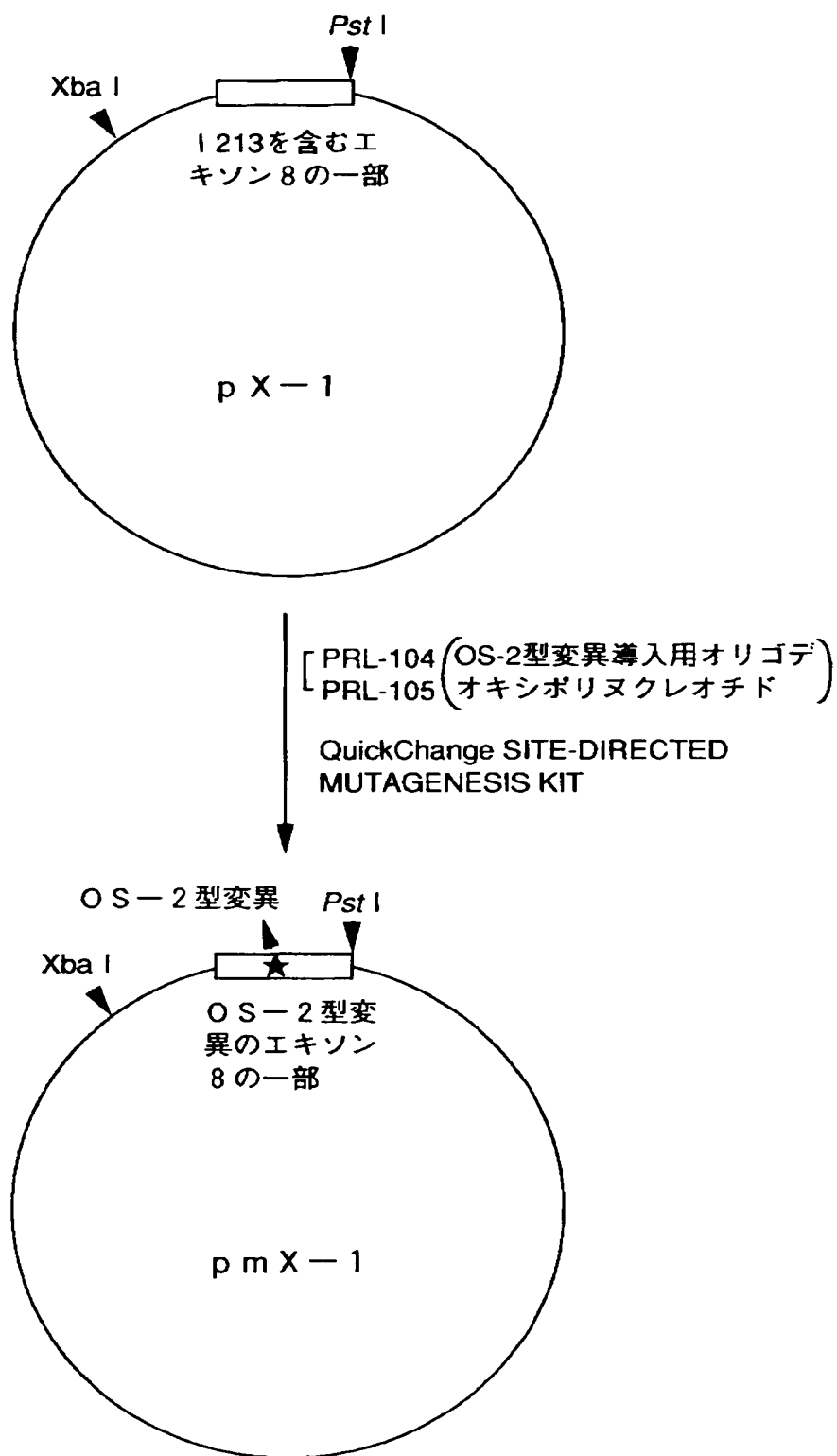
【書類名】

図面

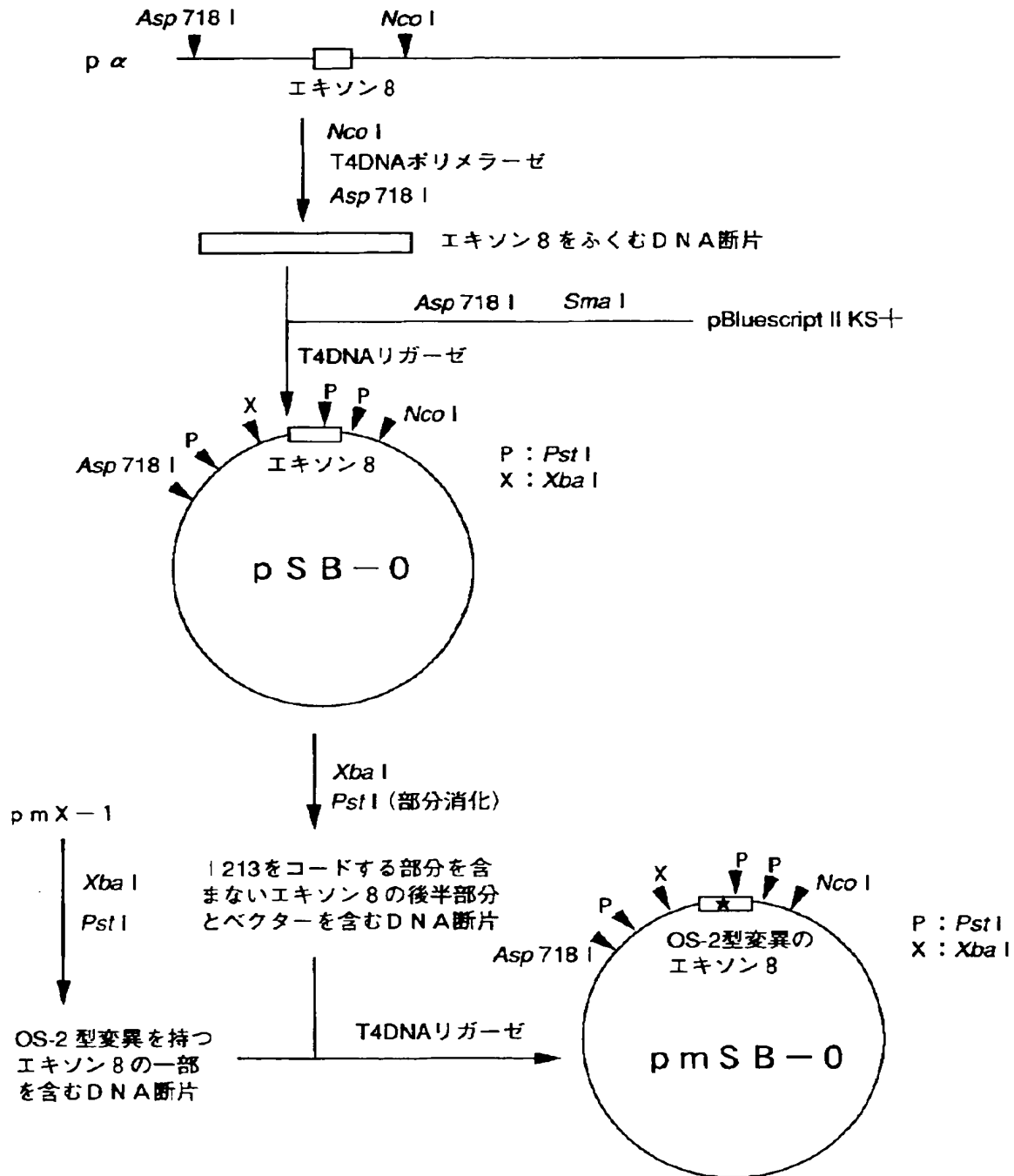
【図 1】



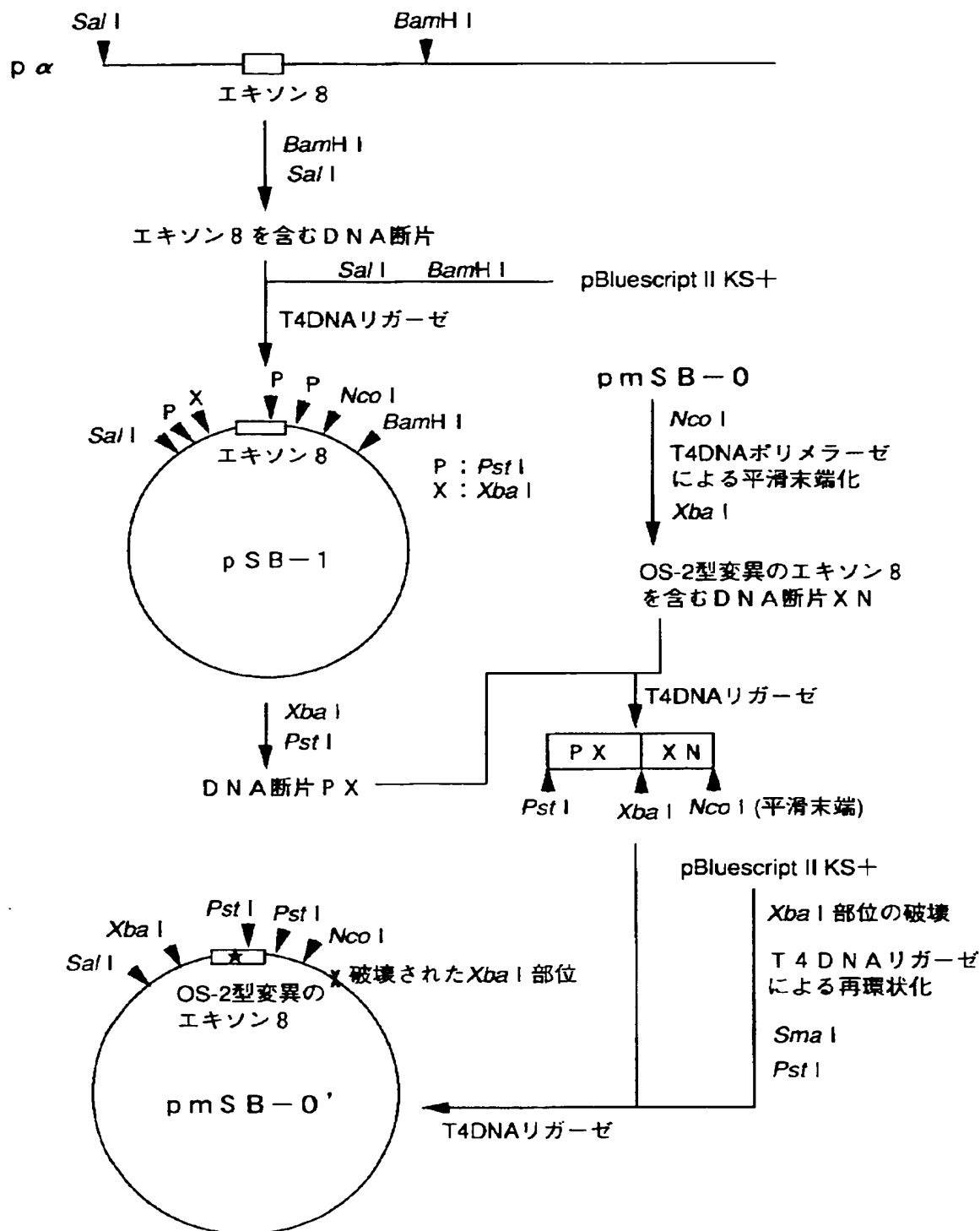
【図 2】



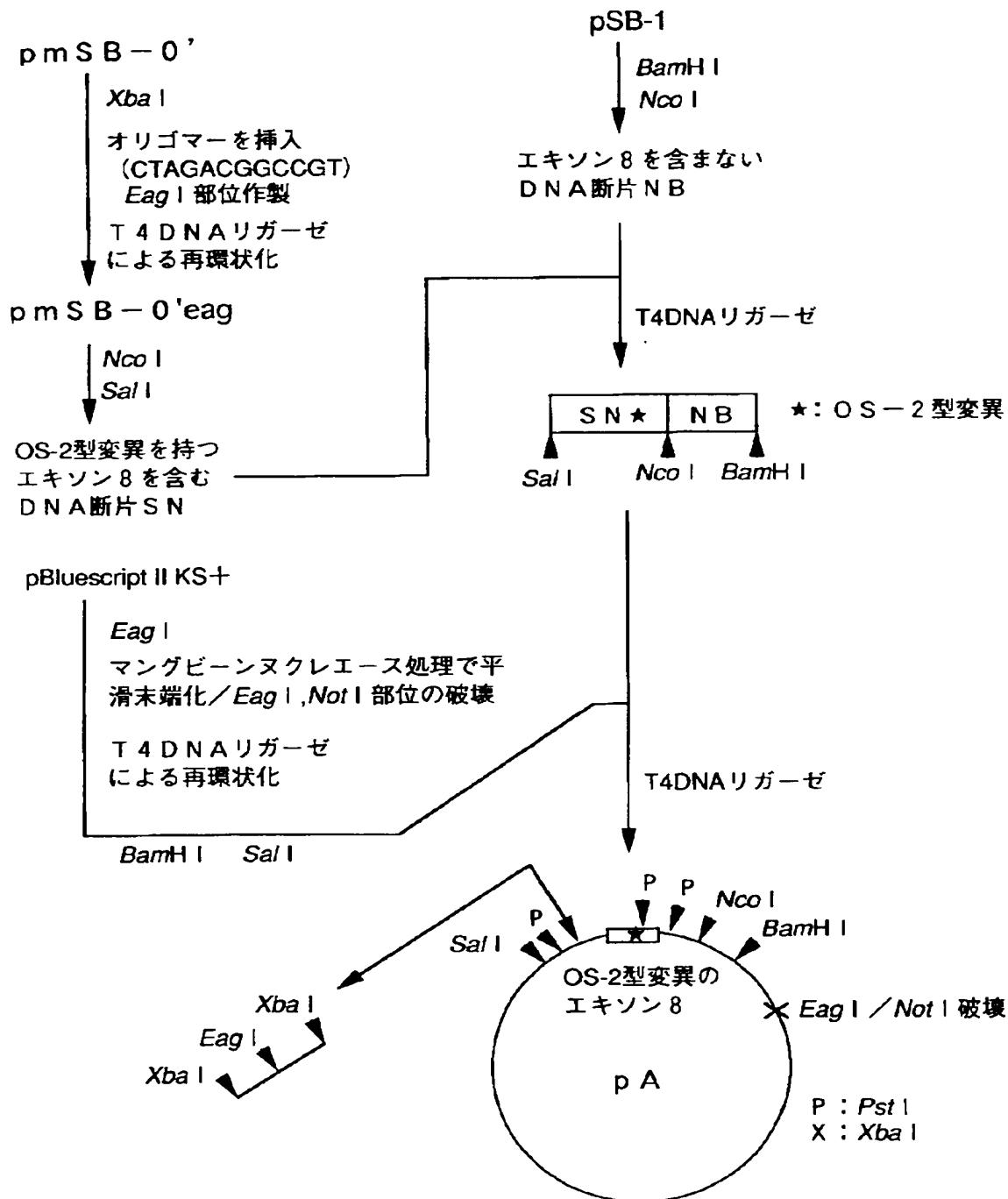
【図3】



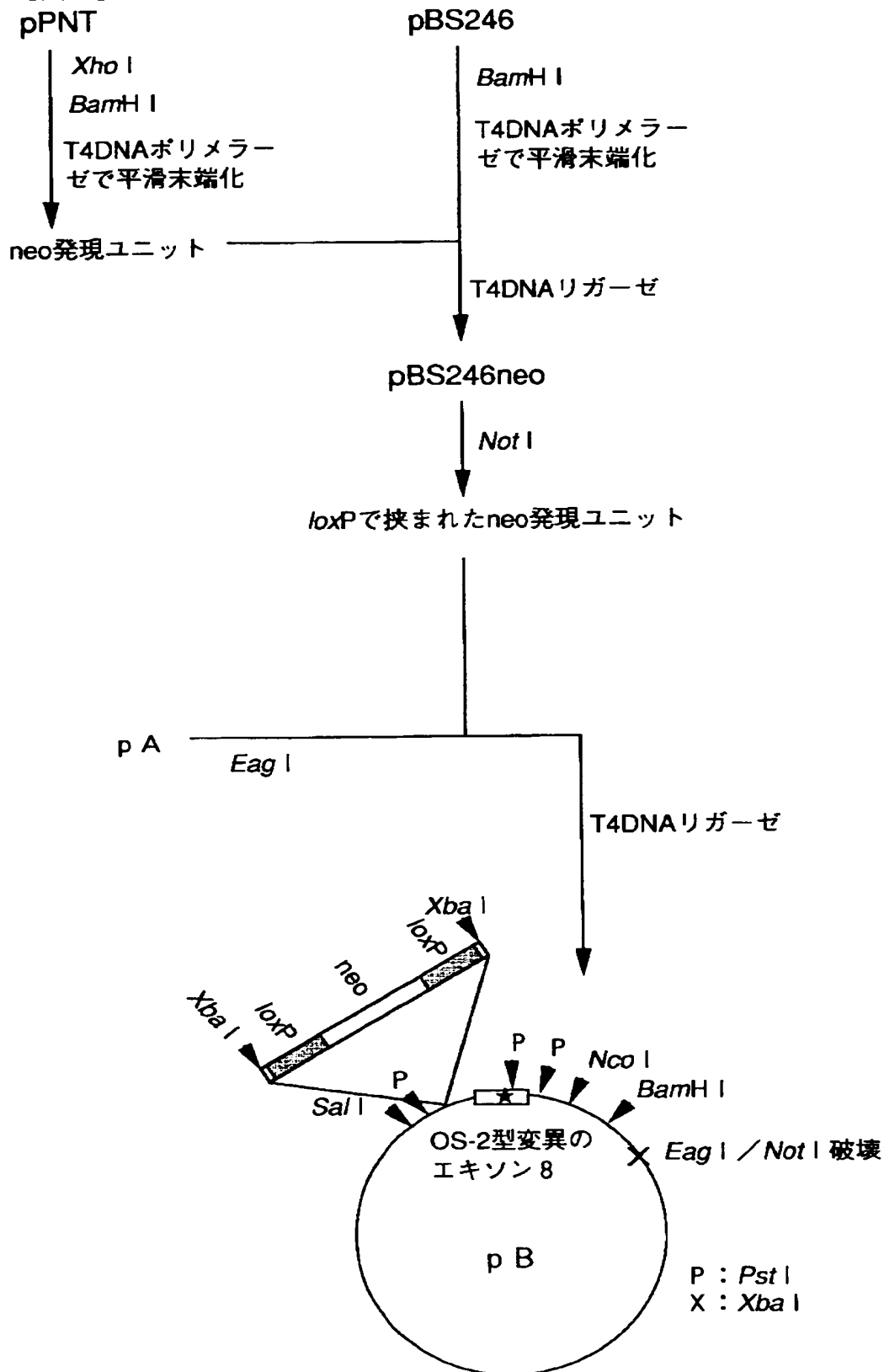
【図4】



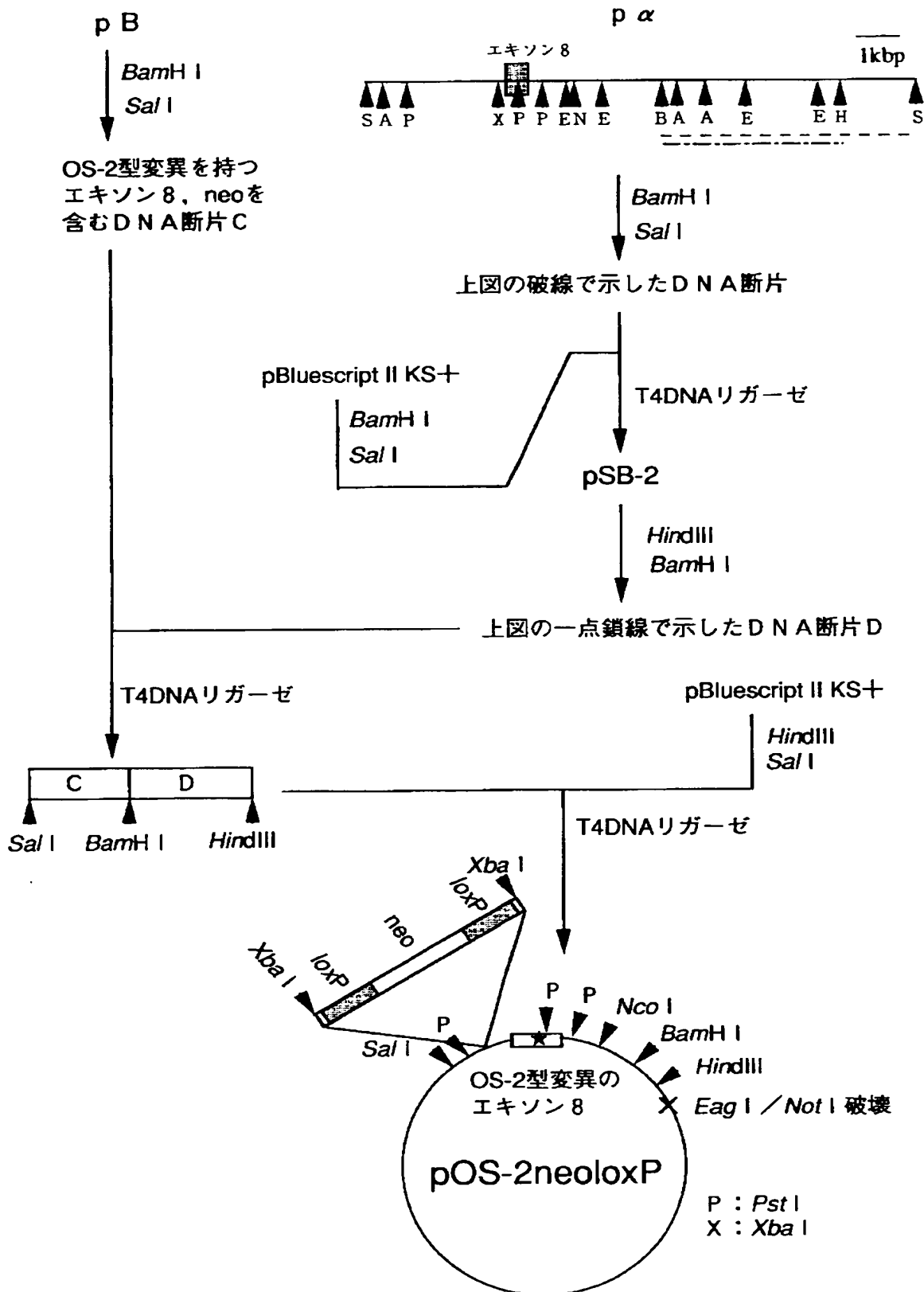
【図5】



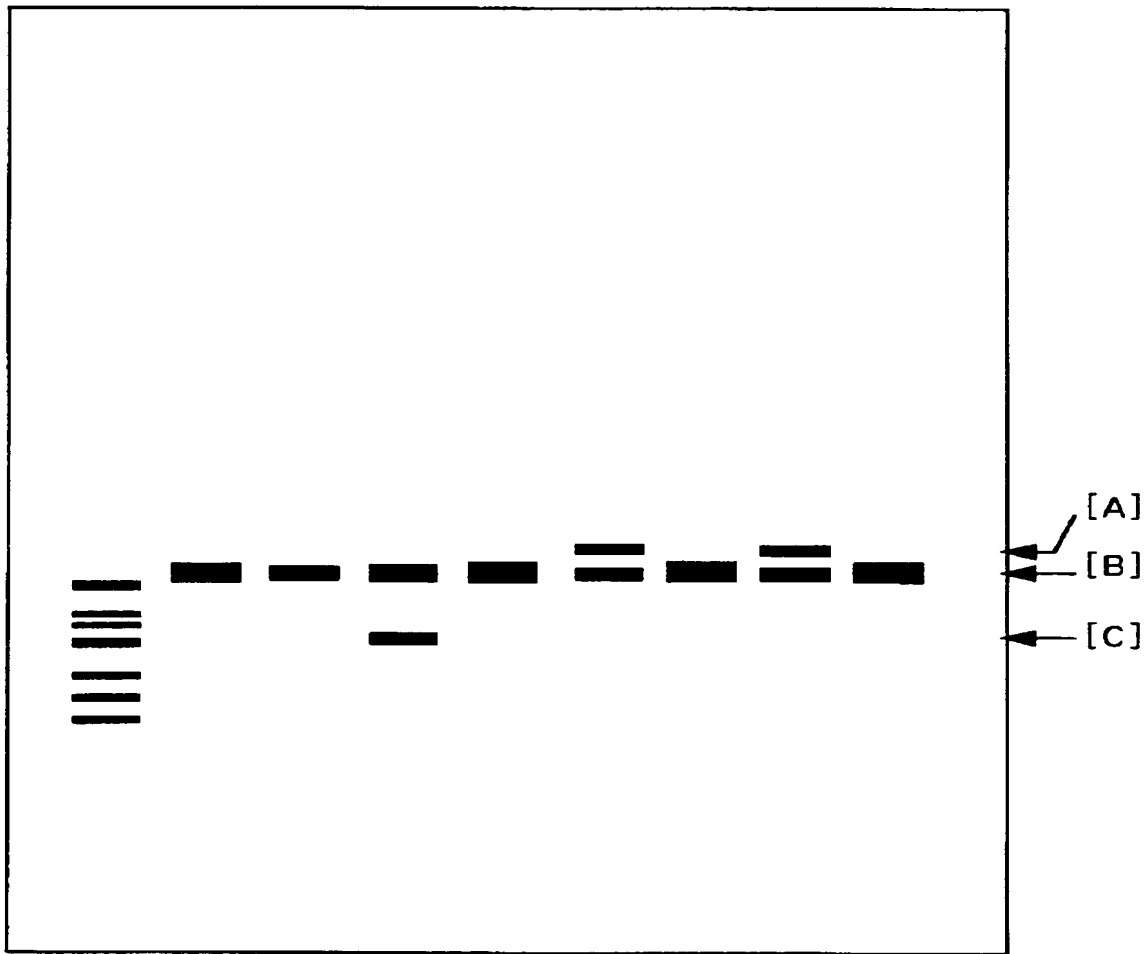
【図 6】



【図 7】



【図 8】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒトにおけるアルツハイマー病患者の病態により近いモデル動物を提供する。

【解決手段】 プレセニリン-1 蛋白のアミノ酸配列中の 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換した変異プレセニリン-1 蛋白（例えばマウス由来のプレセニリン-1 蛋白の第213 番のイソロイシンがイソロイシン以外のアミノ酸、例えばスレオニンに置換した変異プレセニリン-1 蛋白）をコードする DNA 配列をコードする DNA 配列を含む変異プレセニリン-1 遺伝子を有するマウスなどの遺伝子変異動物。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002831  
 【住所又は居所】 東京都中央区日本橋3丁目14番10号  
 【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100096219  
 【住所又は居所】 東京都中央区八重洲1丁目8番12号 藤和八重洲  
 一丁目ビル7階  
 【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100092635  
 【住所又は居所】 東京都中央区八重洲1丁目8-12 藤和八重洲一  
 丁目ビル7F  
 【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002831]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋3丁目14番10号
氏 名	第一製薬株式会社

